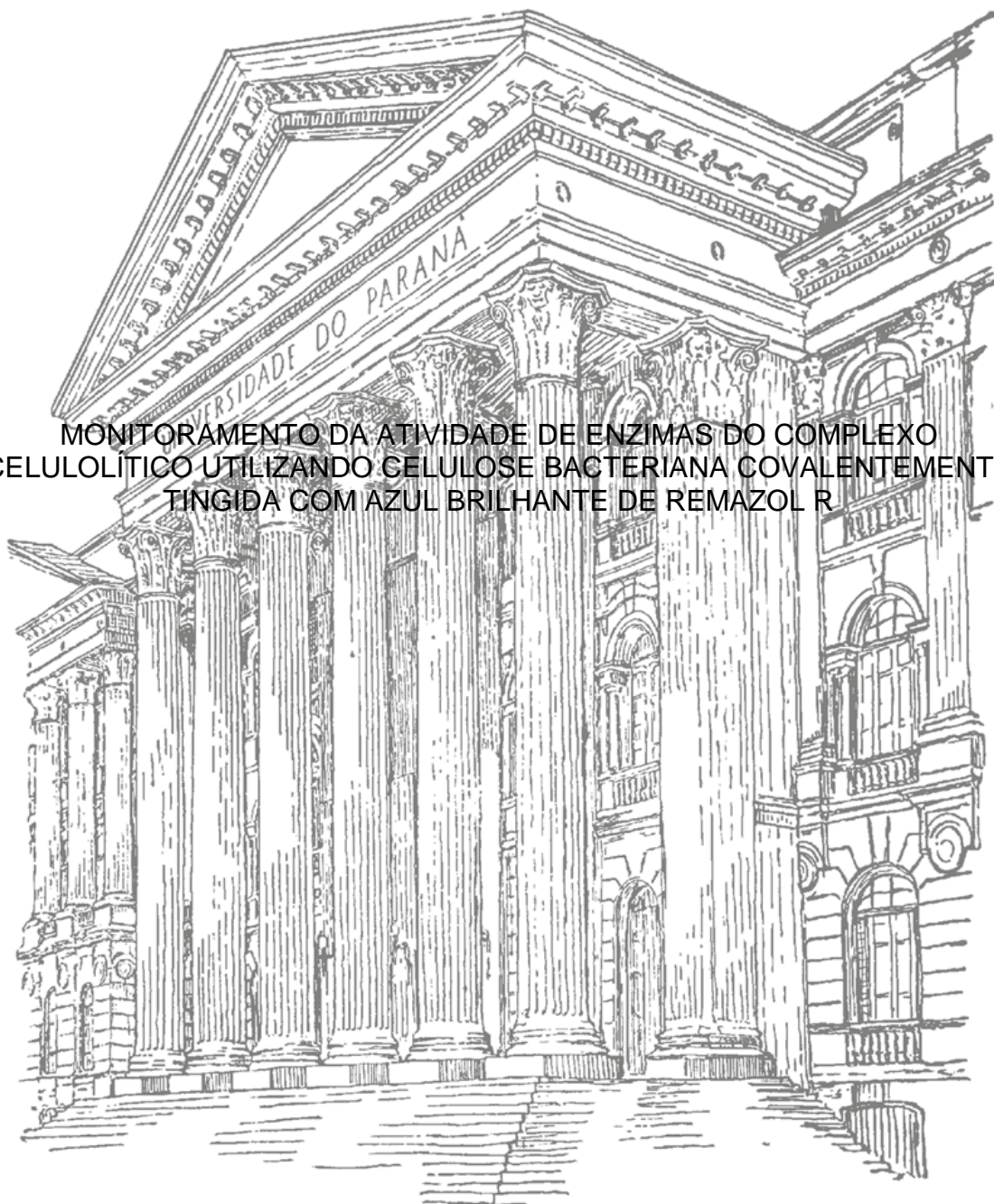


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MARCELA TIBONI

MONITORAMENTO DA ATIVIDADE DE ENZIMAS DO COMPLEXO
CELULOLÍTICO UTILIZANDO CELULOSE BACTERIANA COVALENTEMENTE
TINGIDA COM AZUL BRILHANTE DE REMAZOL R



CURITIBA
2011

MARCELA TIBONI

MONITORAMENTO DA ATIVIDADE DE ENZIMAS DO COMPLEXO
CELULOLÍTICO UTILIZANDO CELULOSE BACTERIANA COVALENTEMENTE
TINGIDA COM AZUL BRILHANTE DE REMAZOL R

Dissertação apresentada como requisito parcial à
obtenção do grau de Mestre em Ciências
Farmacêuticas do Programa de Pós-Graduação em
Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da
Saúde, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. José Domingos Fontana
Coorientador: Dr. Maurício Passos

CURITIBA
2011

Tiboni, Marcela

Monitoramento da atividade de enzimas do complexo celulolítico utilizando celulose bacteriana covalentemente tingida com azul brilhante de remazol R / Marcela Tiboni – Curitiba, 2011.

x, 99f.: il. (algumas color.); 29,7 cm

Orientador: Dr. José Domingos Fontana

Co-orientador: Dr. Maurício Passos

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

1. Enzimas celulolíticas. 2. Celulose bacteriana. 3. Hidrólise enzimática. I. Título.

CDD 660.0
CDU 66.093.8

À minha mãe Maria Angélica

Ao meu pai Vanio e sua esposa Sheila

Às minhas irmãs Rafaelle, Fernanda e Giovanna

Por todo carinho e companheirismo

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador José Domingos Fontana pelas sábias idéias, constante incentivo, sempre dando-me oportunidade de desenvolvimento profissional e pessoal.

Ao meu coorientador Maurício Passos por sua ajuda em buscar recursos que possibilitaram a realização desse trabalho.

À minha amiga e colega de laboratório Adélia que, sem reservas, compartilhou comigo seus conhecimentos, dando-me a oportunidade de aprender através de seus questionamentos, sempre tornando o ambiente de trabalho cheio de companheirismo.

À minha mãe Maria Angélica que sempre me deu amor e força, e, acima de tudo valorizou meus potenciais.

Ao meu pai Vanio e sua esposa Sheila, que com muito carinho sempre me estimularam a dar este passo, e a seguir na carreira acadêmica.

Ao Guilherme pela amizade, carinho, compreensão e diversos momentos de descontração que tornaram mais fácil seguir adiante.

Às minhas irmãs Rafaelle, Fernanda e Giovanna, que sempre estiveram presentes me aconselhando e incentivando com carinho e dedicação.

Às amigas Alessandra, Bianca, Georgia, Giovana e Raquel pelo companheirismo e amizade, mesmo estando por vezes distantes.

À Tânia Maria Bordin Bonfin, do departamento de farmácia da Universidade Federal do Paraná, pela doação de amostras de vinho em decomposição, para isolamento do microrganismo *Gluconacetobacter xylinus*.

À Denise Milleo, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Ponta Grossa/PR, pela doação da cepa de *Gluconacetobacter xylinus*.

Ao Éder M. Bordin, da empresa Novozymes Latin America Ltda - Araucária/PR, pela doação de amostras de enzimas celulolíticas.

À Grazielli da Rocha, do departamento de química da Universidade Federal do Paraná, pela realização das análises de espectroscopia no infravermelho.

Ao Anderson Barison, do departamento de química da Universidade Federal do Paraná, por sua dedicação na interpretação dos resultados de ressonância

magnética nuclear, e sua esposa Francinete Ramos Campos, do departamento de farmácia da Universidade Federal do Paraná, que tão gentilmente fez o intermédio.

À Ana Rita Nogueira, da EMBRAPA de São Carlos/SP, pela moagem das amostras de celulose bacteriana em moinho criogênico.

Ao Luciano Morais Lião, do instituto de química da Universidade Federal de Goiás, pela realização das análises de ressonância magnética nuclear.

À Capes, pelo auxílio financeiro que possibilitou a realização deste trabalho.

A todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para a execução desta dissertação de Mestrado.

Ganhamos força, coragem e confiança a cada experiência em que
verdadeiramente paramos para enfrentar o medo.

Eleanor Roosevelt

RESUMO

O cultivo de colônias de *Gluconacetobacter xylinus*, convenientemente isoladas a partir de fermentado acético de vinho tinto em meio caldo Alabama modificado, produziu membranas de celulose bacteriana (CB), as quais foram purificadas através de tratamento aniônico, confirmado por técnica de reflexão total atenuada no infravermelho médio. A CB possui diversas vantagens quando comparada com a vegetal, já que suas fibras são orientadas de forma randômica, fazendo com que ela possua rápida hidrólise com microrganismos que possuam complexos celulolíticos, propriedade esta explorada no presente trabalho. A utilização de fruto-oligossacarídeos como fonte alternativa de carbono para crescimento e produção de membranas de CB, utilizando cepa padrão de *G. xylinus* ATCC 23769, mostrou eficiente aumento no crescimento celular, tanto para o hidrolisado parcial de inulina cítrico quanto fosfórico (pH 2,5, temperatura de 95°C, tempos 5 e 25 minutos) comparativamente aos cultivos contendo os monossacarídeos glucose e frutose. As membranas de CB previamente purificadas foram trituradas e tingidas covalentemente com o corante Azul Brilhante de Remazol R com o objetivo de agir como substrato cromogênico para a detecção e mensuração da atividade de enzimas do complexo celulolítico. A ligação covalente entre o grupo sulfito do corante e o carbono 6 das unidades de anidrogucose, foi confirmado por técnicas espectroscópicas de ressonância magnética nuclear, tanto de núcleos ^{13}C quanto ^1H . As películas de CB covalentemente tingidas ou não, foram submetidas a processo de sacarificação frente a ataque de enzimas celulasas de *Trichoderma reesei* (endo-glucanases e celobiohidrolases) e β -glucosidade concentrada de *Aspergillus niger* em quantidades equivalentes. Através de planejamento fatorial 2^2 em estrela tendo como variáveis a temperatura de hidrólise (entre 26-56°C) e proporção entre estas enzimas (variando entre 23:77-77:23), observa-se que após 72h a CB *in natura* possui maior potencial hidrolítico seguida pela CB Azure, que os substratos papel de filtro Whatman n.1, celulose micro-cristalina, algodão hidrófilo e bagaço de cana-de-açúcar tingidos, ou não. O ensaio de potencial de sacarificação das enzimas também mostra que a CB *in natura* necessita menor carga enzimática para a liberação de 2 mg de açúcares redutores, seguida pela CB Azure, sendo esta mais hidrolisável que o papel de filtro Whatman n.1, substrato padrão para esse tipo de ensaio. Em segundo planejamento fatorial 2^2 em estrela, alterando temperatura de hidrólise (entre 36-64°C) e a velocidade de agitação (entre 80- 240 rpm) dos incubados, após 1h de hidrólise de CB, a temperatura foi a variável mais significativa para o aumento na porcentagem de liberação de açúcares redutores. A cinética de hidrólise do substrato CB Azure, confirmou correlação entre a liberação dos produtos não tingidos vs. tingidos, através de teste estatístico de correlação de Pearson (r 0,9856) e teste t com nível de confiança de 99%. Técnicas de cromatografia em camada delgada foram utilizadas para avaliar os produtos de hidrólise confirmando a liberação principalmente de glucose livre, seguida de celobiose, e dos produtos Azure, glucose-RBB e celobiose-RBB.

Palavras-chave: Celulose bacteriana Azure, Enzimas celulolíticas, Hidrólise enzimática, Planejamento Fatorial e Correlação de Pearson.

ABSTRACT

Colonies cultivation of *Gluconacetobacter xylinus*, conveniently isolated from the acetic fermentation of red wine, in modified medium Alabama produced bacterial cellulose (BC) membranes, which were purified by anion treatment, confirmed by attenuated total reflection technique of mid-infrared spectroscopy. The BC has several advantages when compared with the vegetal one. Their fibers are oriented randomly, causing it to have rapid hydrolysis with cellulolytic microorganisms complex, a property exploited in this work. The use of fructo-oligosaccharides as alternative carbon source for cultivation and BC production, using a standard strain of *G. xylinus* ATCC 23769, was shown efficiently increase in cell growth for citric as phosphoric acid inulin partial hidrolysate (pH 2.5, 95° C, 5 and 25 minutes) compared to media containing the monosaccharides glucose and fructose. The purified BC membranes were previously milled and then covalently dyed with Remazol R Brilliant Blue with the objective of acting as a chromogenic substrate for detecting and measuring the activity of cellulolytic enzymes. The covalent bind among sulphite dye group and anhydroglucose carbon 6 of cellulose was confirmed by ^{13}C and ^1H nuclear magnetic resonance spectroscopic technique. Pellicles of BC, covalently dyed or not, were subjected to saccharification process by cellulases enzymes of *Trichoderma reesei* (endo-glucanases and cellobiohydrolases) and β -glucoside concentrated from *Aspergillus niger* in equivalent amounts. Star factorial design 2^2 having as variables hydrolysis temperature (among 26-56 ° C) and enzymes proportion (ranging from 23:77 to 77:23), shown after 72h better hydrolytic potencial for *in natura* BC, followed by BC Azure, than filter paper Whatman n.1, microcrystalline cellulose, cotton and sugar cane bagasse, dyed or not. The saccharification enzymes potencial test shown that *in natura* BC also requires fewer enzymes load for release 2 mg of reducing sugars, followed by BC Azure, which is easily hydrolyzable than the filter paper Whatman n.1, standard substrate for this test. A second star factorial design 2^2 , changing hydrolysis temperature (among 36-64 ° C) and agitation speed (ranging from 80 to 240 rpm) of the incubated, after 1h hydrolysis of BC, the temperature shows be the most significantly variable to increase the percentage of reducing sugars release. The hydrolysis kinetics of BC Azure confirmed correlation among the release of undyed (reducing sugars) and dyed products through statistical Pearson correlation (r of 0,9856) and t with confidence level of 99%. Thin thin layer chromatography technique were used to measure the mainly hydrolysis products, glucose and cellobiose, and Azure products, glucose-RBB and cellobiose-RBB.

Key words: Bacterial cellulose-Azure, Cellulolytic enzymes, Enzymatic cellulolysis, Factorial design, Pearson correlation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - ESQUEMA DE PRODUÇÃO DE ETANOL A PARTIR DE DIFERENTES MATÉRIAS-PRIMA.....	12
FIGURA 2 - PROJETOS EM DESENVOLVIMENTO/CONSTRUÇÃO DE PRODUÇÃO DE BIOETANOL NOS ESTADOS UNIDOS	13
FIGURA 3 - ESTRUTURA MOLECULAR DA CELULOSE, CELOBIOSE E LIGAÇÃO B-GLICOSÍDICA	14
FIGURA 4 - ESTRUTURA SUPRAMOLECULAR DAS FIBRILAS DE CELULOSE	16
FIGURA 5 - ARRANJO DAS LIGAÇÕES DE HIDROGÊNIO NA CELULOSE DE TIPOS CRISTALINOS IA E IB	18
FIGURA 6 - EXTRUSÃO DE CADEIAS DE CELULOSE PELA BACTÉRIA <i>GLUCONACETOBACTER XYLINUS</i>	22
FIGURA 7 - NÍVEIS DE ESTRUTURA NAS PROTEÍNAS	24
FIGURA 8 - MECANISMO DE AÇÃO DAS ENZIMAS CELULOLÍTICAS	26
FIGURA 9 - ESQUEMA DE REAÇÃO DE REDUÇÃO DO ÁCIDO 3,5-DINITROSALICILICO FORMANDO COMPOSTO COLORIDO ...	29
FIGURA 10 - ESTRUTURA DO CORANTE AZUL BRILHANTE DE REMAZOL R	32
FIGURA 11 - REAÇÃO DE FIXAÇÃO DO CORANTE RBB NAS FIBRAS DA CELULOSE	32
FIGURA 12 - FÓRMULA DA LEI DE BEER-LAMBERT PARA DETERMINAÇÃO DO COEFICIENTE DE ABSORÇÃO DE UMA SUBSTÂNCIA	33
FIGURA 13 - ESQUEMA DE REAÇÃO DE DETERMINAÇÃO DE AÇÚCARES TOTAIS PELO MÉTODO FENOL SULFÚRICO	34
FIGURA 14 - EXPERIMENTO DE CINÉTICA DE CRESCIMENTO DE <i>GLUCONACETOBACTER XYLINUS</i>	42
FIGURA 15 - ESQUEMA DE LIMPEZA DAS MEMBRANAS DE CELULOSE BACTERIANA	44
FIGURA 16 - FÓRMULAS PARA CÁLCULOS DE AÇÚCARES REDUTORES MENSURADOS PELO MÉTODO DNS.....	51
FIGURA 17 - FÓRMULA PARA CÁLCULO DE CÉLULAS TOTAIS DE <i>GLUCONACETOBACTER XYLINUS</i>	51
FIGURA 18 - FÓRMULA PARA CÁLCULO DE MENSURAÇÃO DE CORANTE RBB.....	52
FIGURA 19 - PRODUÇÃO DE MEMBRANAS DE CELULOSE BACTERIANA EM MEIO CALDO ALABAMA MODIFICADO	52

FIGURA 20 - MEMBRANAS DE CELULOSE BACTERIANA.....	53
FIGURA 21 - CCD COM PERFIL DOS CARBOIDRATOS ALTERNATIVOS UTILIZADOS PARA O CULTIVO DE <i>GLUCONACETOBACTER</i> <i>XYLINUS</i>	56
FIGURA 22 - MEMBRANAS DE CELULOSE BACTERIANA APÓS PROCESSO DE LAVAGEM	59
FIGURA 23 - SUBSTRATOS CELULÓSICOS ANTES E APÓS TINGIMENTO COM O CORANTE AZUL BRILHANTE DE REMAZOL R	61
FIGURA 24 - CCD DOS PRODUTOS DE HIDRÓLISE COM ENZIMAS CELULOLÍTICAS DE CELULOSE BACTERIANA <i>IN NATURA</i> E AZURE-RBB	81
FIGURA 25 - CCD DE FRAÇÕES OBTIDAS POR COLUNA PREPARATIVA DE HIDRÓLISADO DE CELULOSE BACTERIANA AZURE-RBB82	
FIGURA 26 - ESTRUTURA MOLECULAR DA GLUCOSE-RBB E CELOBIOSE- RBB.....	88

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 - ESTATÍSTICA DAS RESERVAS DE PETRÓLEO MUNDIAIS PARA OS PAÍSES DA OPEP NO ANO DE 2008	6
GRÁFICO 2 - EVOLUÇÃO DO PREÇO DO BARRIL DE PETRÓLEO ENTRE OS ANOS DE 1997 E 2010	8
GRÁFICO 3 - EVOLUÇÃO DA PRODUÇÃO DE ETANOL E CANA-DE-AÇÚCAR NO BRASIL ENTRE OS ANOS 1990 E 2009	10
GRÁFICO 4 - ACOMPANHAMENTO DO PH, CÉLULAS TOTAIS E MEMBRANAS DE CELULOSE PRODUZIDAS DURANTE CINÉTICA DE CRESCIMENTO DO <i>GLUCONACETOBACTER XILINUS</i>	54
GRÁFICO 5 - ACOMPANHAMENTO DOS AÇÚCARES REDUTORES LIBERADOS DURANTE CINÉTICA DE CRESCIMENTO DO <i>GLUCONACETOBACTER XILINUS</i>	55
GRÁFICO 6 - PERFIL DOS AÇÚCARES DOS MEIOS DE CULTIVO CALDO ALABAMA MODIFICADO CONTENDO FOS.....	57
GRÁFICO 7 - RESULTADOS DE CRESCIMENTO E PRODUÇÃO DE MEMBRANAS DE CELULOSE EM CEPA PADRÃO DE <i>GLUCONACETOBACTER XYLINUS</i> EM CULTIVOS UTILIZANDO DIFERENTES FONTES DE CARBONO	58
GRÁFICO 8 - ACOMPANHAMENTO DO PROCESSO DE LAVAGEM DAS MEMBRANAS DE CELULOSE BACTERIANA	59
GRÁFICO 9 - ESPECTRO NO INFRAVERMELHO DA CELULOSE BACTERIANA POR ATR	60
GRÁFICO 10 - RESULTADOS DO PLANEJAMENTO FATORIAL PARA O ALGODÃO HIDRÓFILO IN NATURA E AZURE-RBB.....	63
GRÁFICO 11 - RESULTADOS DO PLANEJAMENTO FATORIAL PARA CELULOSE MICROCRISTALINA (AVICEL) IN NATURA E AZURE-RBB	64
GRÁFICO 12 - RESULTADOS DO PLANEJAMENTO FATORIAL PARA CELULOSE BACTERIANA IN NATURA E AZURE-RBB.....	64
GRÁFICO 13 - RESULTADOS DO PLANEJAMENTO FATORIAL PARA PAPEL DE FILTRO WHATMAN N. 1 IN NATURA E AZURE-RBB	65
GRÁFICO 14 - RESULTADOS DO PLANEJAMENTO FATORIAL PARA BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR IN NATURA E AZURE-RBB .	66
GRÁFICO 15 - COMPARAÇÃO DA HIDRÓLISE DOS SUBSTRATOS CELULÓSICOS <i>IN NATURA</i> E TINGIDOS.....	67
GRÁFICO 16 - RESÍDUOS OBTIDOS PARA AJUSTE LINEAR DO PLANEJAMENTO FATORIAL DE OTIMIZAÇÃO DE HIDRÓLISE UTILIZANDO DIFERENTES SUBSTRATOS CELULÓSICOS.....	70

GRÁFICO 17 - RESULTADOS DO PLANEJAMENTO FATORIAL EM ESTRELA PARA CELULOSE BACTERIANA IN NATURA E AZURE-RBB	71
GRÁFICO 18 - RESÍDUOS OBTIDOS PARA AJUSTE QUADRÁTICO DO PLANEJAMENTO FATORIAL ESTRELA DE OTIMIZAÇÃO DE HIDRÓLISE UTILIZANDO DIFERENTES SUBSTRATOS CELULÓSICOS.....	72
GRÁFICO 19 - SUPERFÍCIE DE RESPOSTA OBTIDA PARA AJUSTE QUADRÁTICO DO PLANEJAMENTO FATORIAL ESTRELA DE OTIMIZAÇÃO DE HIDRÓLISE DA CELULOSE BACTERIANA <i>IN NATURA</i>	73
GRÁFICO 20 - SUPERFÍCIE DE RESPOSTA OBTIDA PARA AJUSTE QUADRÁTICO DO PLANEJAMENTO FATORIAL ESTRELA DE OTIMIZAÇÃO DE HIDRÓLISE DA CELULOSE BACTERIANA AZURE-RBB	73
GRÁFICO 21 - ENSAIO COMPARATIVO DE DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL DE SACARIFICAÇÃO DAS ENZIMAS COM DIFERENTES SUBSTRATOS	74
GRÁFICO 22 - OTIMIZAÇÃO DO PLANEJAMENTO FATORIAL ESTRELA PARA CELULOSE BACTERIANA IN NATURA E AZURE-RBB ..	75
GRÁFICO 23 - RESÍDUOS OBTIDOS PARA AJUSTE QUADRÁTICO DO PLANEJAMENTO FATORIAL ESTRELA DE OTIMIZAÇÃO DE HIDRÓLISE PARA CELULOSE BACTERIANA <i>IN NATURA</i> E AZURE-RBB	77
GRÁFICO 24 - SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA PLANEJAMENTO FATORIAL EM ESTRELA PARA OTIMIZAÇÃO DE HIDRÓLISE PARA CELULOSE BACTERIANA IN NATURA	78
GRÁFICO 25 - SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA PLANEJAMENTO FATORIAL EM ESTRELA PARA OTIMIZAÇÃO DE HIDRÓLISE PARA CELULOSE BACTERIANA AZURE-RBB.....	78
GRÁFICO 26 - CORRELAÇÃO DE MG GLUCOSE/ML OBTIDAS PELO MÉTODOS DNS VS. ABSORBÂNCIA DO CORANTE LIBERADO DURANTE HIDRÓLISE EM 593 NM.....	79
GRÁFICO 27 - CORRELAÇÃO DE PEARSON ENTRE CORANTE RBB E AÇUCARES REDUTORES EM MMOL/ENSAIO LIBERADOS DURANTE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA.....	80
GRÁFICO 28 - DENSITOMETRIA A650 NM DOS INCUBADOS DE CELULOSE BACTERIANA	81
GRÁFICO 29 - ESPECTRO DE RMN ¹³ C POR CP-MAS DA CELULOSE BACTERIANA <i>IN NATURA</i> E AZURE-RBB.....	83
GRÁFICO 30 - ESPECTRO DE RMN ¹ H POR HR-MAS DA CELULOSE BACTERIANA AZURE-RBB E POR TBI DO PADRÃO DE CORANTE RBB R.....	84

GRÁFICO 31 - ESPECTRO DE RMN ^{13}C DOS PADRÕES DE CORANTE RBB R, GLUCOSE E CELOBIOSE	85
GRÁFICO 32 - REGIÃO ENTRE 3,85-3,45 E 74-52PPM DO ESPECTRO DE RMN 2D ^1H - ^{13}C POR HSQC DAS BANDAS 2 E 3.....	86
GRÁFICO 33 - REGIÃO ENTRE 5,2-4,2 E 110-85 PPM DO ESPECTRO DE RMN 2D ^1H - ^{13}C POR HSQC DAS BANDAS 2 E 3.....	87

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - COMPOSIÇÃO REAGENTE DINITROSALICÍLICO (DNS).....	35
TABELA 2 - COMPOSIÇÃO CALDO ALABAMA MODIFICADO/ LITRO	40
TABELA 3 - PLANEJAMENTO FATORIAL DE OTIMIZAÇÃO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA	47
TABELA 4 - PLANEJAMENTO FATORIAL DE OTIMIZAÇÃO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA PARA CELULOSE BACTERIANA.....	49
TABELA 5 - COEFICIENTES DE CORRELAÇÃO DE PEARSON ENTRE QUANTIDADE DE AÇÚCAR REDUTOR E CORANTE LIBERADO DURANTE HIDRÓLISE COMPARATIVA DE DIFERENTES SUBSTRATOS AZURE-RBB	68
TABELA 6 - EFEITOS DE PRIMEIRA E SEGUNDA ORDEM DO PLANEJAMENTO FATORIAL DE OTIMIZAÇÃO PARA A CELULOSE BACTERIANA E O PAPEL DE FILTRO WHATMAN N.1	68
TABELA 7 - ANOVA PARA AJUSTE LINEAR DO PLANEJAMENTO FATORIAL PARA CELULOSE BACTERIANA <i>IN NATURA</i>	69
TABELA 8 - ANOVA PARA AJUSTE LINEAR DO PLANEJAMENTO FATORIAL PARA CELULOSE BACTERIANA AZURE-RBB.....	69
TABELA 9 - ANOVA PARA AJUSTE LINEAR DO PLANEJAMENTO FATORIAL PARA PAPEL DE FILTRO WHATMAN N.1 <i>IN NATURA</i>	69
TABELA 10 - ANOVA PARA AJUSTE LINEAR DO PLANEJAMENTO FATORIAL PARA PAPEL DE FILTRO WHATMAN N.1 AZURE-RBB.....	70
TABELA 11 - ANOVA PARA AJUSTE QUADRÁTICO DO PLANEJAMENTO FATORIAL ESTRELA PARA CELULOSE BACTERIANA <i>IN NATURA</i>	71
TABELA 12 - ANOVA PARA AJUSTE QUADRÁTICO DO PLANEJAMENTO FATORIAL ESTRELA PARA CELULOSE BACTERIANA AZURE-RBB.....	71
TABELA 13 - COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO DE PEARSON ENTRE QUANTIDADE DE AÇÚCAR REDUTOR E CORANTE RBB EM TESTE DE POTENCIAL DE SACARIFICAÇÃO ENZIMÁTICO ...	74
TABELA 14 - EFEITOS DE PRIMEIRA E SEGUNDA ORDEM DO PLANEJAMENTO FATORIAL DE OTIMIZAÇÃO PARA A CELULOSE BACTERIANA	76
TABELA 15 - ANOVA PARA AJUSTE DO PLANEJAMENTO FATORIAL DE OTIMIZAÇÃO PARA CELULOSE BACTERIANA <i>IN NATURA</i>	76
TABELA 16 - ANOVA PARA AJUSTE DO PLANEJAMENTO FATORIAL DE OTIMIZAÇÃO PARA CELULOSE BACTERIANA AZURE-RBB...	77

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

adp.	- Adaptado
AIE	- Agência internacional de energia
ANOVA	- Análise de variância
ATR	- Reflexão total atenuada
Azure	- Tingido com o corante remazol azul brilhante
BGL	- β -Glucosidase
C	- Carbono
CB	- Celulose bacteriana
CBH	- Exo-glucanases
CBM	- Módulo de ligação ao carboidrato (<i>Carbohydrate binding modules</i>)
CCD	- Cromatografia de camada delgada
CLAE	- Cromatografia líquida de alta eficiência
CMC	- Carboximetilcelulose
COROL	- Cooperativa agroindustrial – Rolândia/PR
CP-MAS	- polarização cruzada em rotação do ângulo mágico (<i>Cross polarization magic angle spinning</i>)
DNS	- Ácido 3,5 dinitrosalicilato
DOE	- Departamento de Energia Americano (<i>U.S. department of energy</i>)
EG	- Endo-gluconases
FOS	- Fruto-oligossacarídeos
FPU	- Unidade de papel de filtro (<i>filter paper unit</i>)
FTIR	- Infravermelho médio
GP	- Grau de polimerização
H	- Hidrogênio
HMBC	- Correlação heteronuclear através de múltiplas ligações (<i>Heteronuclear multiple-bond correlation</i>)
HMF	- Hidroximetilfurfural
HR-MAS	- Alta resolução em rotação do ângulo mágico (<i>High resolution magic angle spinning</i>)
HSQC	- Coerência quântica heteronuclear única (<i>Heteronuclear Single</i>

Quantum Coherence)

LQBB	- Laboratório de quimio/biotecnologia de biomassa
n.	- Número
OPEP	- Organização de países exportadores de petróleo
PF	- Papel de filtro Whatman n.1
q.s.p	- Quantidade suficiente para
RBB	- Remazol azul brilhante (<i>remazol brilliant blue</i>)
RMN	- Ressonância magnética nuclear
TBI	- (<i>Tuneable multinuclear triple</i>)
vs.	- Versus
ZnSe	- Seleneto de zinco

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	OBJETIVOS	4
2.1	OBJETIVO PRINCIPAL	4
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	4
3	REVISÃO DA LITERATURA	6
3.1	COMBUSTÍVEIS	6
3.2	BIOCOMBUSTÍVEIS	9
3.2.1	Etanol e bioetanol	10
3.3	CELULOSE	14
3.3.1	Celulose Bacteriana.....	19
3.4	<i>Gluconacetobacter xylinus</i>	21
3.5	ENZIMAS CELULOLÍTICAS.....	23
3.6	MÉTODOS DE MENSURAÇÃO DA ATIVIDADE CELULOLÍTICA.....	28
3.6.1	Método do dinitrosalicilato para mensuração de açúcares redutores	28
3.6.2	Teste de sacarificação de celulasas utilizando papel de filtro.....	29
3.6.3	Teste da carboximetilcelulose para endo-glucanases	30
3.6.4	Métodos utilizando substrato tingido.....	30
3.7	CORANTES.....	31
3.7.1	Azul Brilhante de Remazol R	31
4	METODOLOGIA	34
4.1	MÉTODOS ANALÍTICOS	34
4.1.1	Análise de açúcares totais.....	34
4.1.2	Análise de açúcares redutores	35
4.1.3	Análise de células totais por turbidimetria.....	36
4.1.4	Análise colorimétrica de liberação do corante RBB	37
4.1.5	Análise por espectroscopia no infravermelho	37
4.1.6	Análise por ressonância magnética nuclear	37
4.1.7	Análises por cromatografia em camada delgada.....	38
4.1.8	Análises estatísticas	39
4.2	OBTENÇÃO DE MEMBRANAS DE CELULOSE BACTERIANA.....	40
4.2.1	Isolamento de colônias de <i>Gluconacetobacter xylinus</i> produtoras de celulose.....	40

4.2.2	Cultivo e manutenção da colônia de <i>Gluconacetobacter xylinus</i>	41
4.2.3	Cinética de crescimento de <i>Gluconacetobacter xylinus</i>	41
4.2.4	Cultivo de <i>Gluconacetobacter xylinus</i> utilizando fruto-oligossacarídeos como fonte alternativa de carbono	43
4.3	PROCESSAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DA CELULOSE BACTERIANA	44
4.3.1	Limpeza da celulose bacteriana	44
4.3.2	Secagem da celulose bacteriana	45
4.3.3	Caracterização da celulose bacteriana	45
4.4	OBTENÇÃO DOS MATERIAIS CELULÓSICOS ALTERNATIVOS	45
4.5	TINGIMENTO DOS SUBSTRATOS CELULÓSICOS	46
4.6	INCUBAÇÃO COM ENZIMAS CELULOLÍTICAS	47
4.6.1	Hidrólise comparativa entre diferentes substratos celulósicos	47
4.6.2	Determinação do potencial de sacarificação dos substratos papel de filtro Whatman n.1 e celulose bacteriana	48
4.6.3	Otimização do processo de hidrólise de celulose bacteriana	49
4.6.4	Cinética hidrolítica da celulose bacteriana Azure-RBB	49
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
5.1	CURVAS DE CALIBRAÇÃO PARA ANÁLISE DE AÇÚCARES REDUTORES, CÉLULAS TOTAIS E CORANTE RBB	51
5.2	CULTIVO E ISOLAMENTO DE <i>Gluconacetobacter xylinus</i>	52
5.2.1	CINÉTICA DE CRESCIMENTO DE <i>Gluconacetobacter xylinus</i>	53
5.2.2	Cultivo de <i>Gluconacetobacter xylinus</i> utilizando fruto-oligossacarídeos como fonte alternativa de carbono	55
5.3	PROCESSAMENTO DA CELULOSE BACTERIANA	58
5.4	TINGIMENTO COVALENTE DOS SUBSTRATES CELULÓSICOS	61
5.5	INCUBAÇÃO COM ENZIMAS CELULOLÍTICAS	62
5.5.1	Hidrólise comparativa dos diferentes substratos celulósicos	62
5.5.2	Determinação do potencial de sacarificação das enzimas	73
5.5.3	Otimização do processo de hidrólise de celulose bacteriana	75
5.5.4	Cinética hidrolítica da celulose bacteriana Azure-RBB	79
5.6	ANÁLISE POR CCD E DENSITOMETRIA	80
5.7	ANÁLISE POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR	83
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	89
7	PERSPECTIVAS FUTURAS	91
8	REFERÊNCIAS	92

1 INTRODUÇÃO

Os meios de transporte atuais utilizam como combustível diversos produtos de craqueamento do petróleo, como a gasolina, gás natural e o óleo diesel. Relatórios recentes da OPEP (Organização de Países Exportadores de Petróleo) indicam o aumento do consumo mundial de petróleo para o ano de 2010, sendo grande parte deste aumento devido ao consumo de combustíveis fósseis, para cerca de 86 milhões barris/dia. Porém a taxa de produção global não mostra tendência de aumento na mesma proporção (CAMPOS,2010; MCMILLAN,1997; OPEC,2010). Além disto, existem perspectivas de que a produção aumentará nos próximos anos, chegando ao máximo, e então ocorrerá intenso declínio, até extinção, fenômeno chamado de “pico do petróleo” (HEINBERG,2010). Considerando que 81% da energia comercial mundial dependem de produtos fósseis, a resposta econômica para as alterações de extração e preço do petróleo são sentidas rapidamente, levando a dúvida com relação ao futuro destes petro-combustíveis (ALMEIDA,2009; HEINBERG,2010).

Os petro-combustíveis são os maiores contribuintes para o efeito estufa, devido à emissão de dióxido de carbono durante a combustão, havendo a necessidade da busca de fontes alternativas renováveis de energia, que tragam benefícios ambientais (STICHNOTHE,2009). Os biocombustíveis, assim chamados por serem obtidos através de fontes renováveis de energia, são seguros e biodegradáveis além de possuírem grandes vantagens ambientais como a redução da chuva ácida (CHANG,2010).

O etanol, biocombustível, é produzido pelos Estados Unidos e pelo Brasil por fermentação de açúcares derivados de amido de milho e cana-de-açúcar, respectivamente, em quantidades próximas a 60 bilhões de litros/ano (RFA,2010; UNICA,2010). No Brasil, o processamento da cana-de-açúcar fresca para extração do caldo gera 12% de resíduos, o bagaço de cana-de-açúcar, composto principalmente por celulose (50%), hemicelulose (30%) e lignina (20%). Este resíduo lignocelulósico possui grande potencial como substrato para a produção de bioetanol, por hidrólise ácida (etanol de 2ª geração), enzimática (3ª geração), ou mista (4ª geração) (BUCKERIDGE,2011; ZANIN,2000).

A celulose é o mais conhecido polissacarídeo encontrado na natureza, pois, juntamente com a hemicelulose e lignina forma a parede celular dos vegetais superiores. É composta por milhares de unidades de β -D-glucopiranosose, cerca de dez a quinze mil, unidas por ligação covalente tipo β 1 \rightarrow 4 (SANDGREN,2005). As unidades de anidroglicose, assim como as diferentes fibrilas de celulose interagem intimamente entre si, formando a estrutura cristalina da celulose, através de ligações de hidrogênio internas e externas, o que resulta em fibras compactas completamente insolúveis em água, embora sejam hidratáveis (FONTANA,2004a; LYND,2002). Porém as fibras de celulose na natureza não são puramente cristalinas, são intermediadas por regiões menos compactas, chamadas amorfas, o que resulta em heterogeneidade estrutural, com a presença de alguns micro-poros e capilares suficientemente espaçosos para permitir penetração de moléculas relativamente grandes, incluindo as enzimas celulolíticas (SAXENA,2001).

A caracterização da ultra-estrutura da celulose, por difração de raios-X, mostra que os diferentes arranjos de ligações de hidrogênio inter e intra-molecular origina vários tipos de estruturas cristalinas, sendo quatro principais (DUMITRIU,1998). A forma natural de celulose, chamada de celulose I, é a mais abundante, e possui dois tipos de arranjo cristalino, chamados de fase I α e I β produzidas principalmente por organismos primitivos e plantas superiores, respectivamente (PÉREZ,2001).

A bactéria gram-negativa *Gluconacetobacter xylinus* é um dos microrganismos capazes de sintetizar celulose a partir de uma série de fontes de carbono, como glucose, sacarose, manitol, glicerol, entre outros (KORNMAN,2003; THOMPSON,2001). A celulose bacteriana (CB) vai sendo produzida e, simultaneamente, se arranjando de forma paralela através das ligações de hidrogênio. Esse mecanismo gera uma rede reticulada cujo diâmetro é 100 vezes menor que o das fibras de celulose encontradas na madeira (ROMLING,2002), fazendo com que a CB possua propriedades físico-químicas únicas, como a alta biodegradabilidade em solo e rápida hidrólise com microrganismos, sendo esta última propriedade explorada no presente trabalho (FONTANA,1990; FONTANA,1997).

As enzimas do complexo celulolítico exibem forte sinergia durante o processo de hidrólise da molécula de celulose. Isto ocorre, pois o sistema é composto por três modos de catálise das fibras, aumentando a eficiência de ação quando comparada a

ação isolada das enzimas. As endo-glucanases (EG) clivam as ligações internas nas micro-fibrilas que se encontram nas regiões amorfas; as exo-glucanases (CBH) agem de maneira progressiva a partir das extremidades redutoras (CBH I) ou não-redutoras (CBH II) da celulose; enquanto as β -glucosidases (BGL) atuam nos resíduos de celodextrinas e celobiose liberando glucose livre (KLYOSOV,1995; LYND,2002).

A caracterização das enzimas do complexo celulolítico apresenta estudos cinéticos complexos, já que o substrato natural, a celulose, é insolúvel e estruturalmente variável. Por esse motivo, existem diversos ensaios, a maioria, específicos para cada tipo de enzima, para a mensuração da atividade (GHOSE,1987). Os mais utilizados são escolhidos com base no uso comum e facilidades processuais como o método do ácido 3,5-dinitrosalicílico para mensuração de açúcares redutores (MILLER,1959), o teste de sacarificação de celulasas utilizando papel de filtro Whatman n.1, o teste específico para mensuração de EG utilizando carboximetilcelulose (GHOSE,1987), e os testes colorimétricos de sacarificação utilizando substratos tingidos, como por exemplo, celulose micro-cristalina Avicel®, tingida com o corante Azul Brilhante de Remazol R (PALMISANO,1993; ZEIKUS,1983).

As propriedades únicas da CB, somadas a técnica de substrato cromogênico, foram exploradas no presente trabalho para a obtenção de uma técnica precisa, rápida e exata para a determinação do potencial celulolítico de complexos enzimáticos ou enzimas isoladas. As membranas foram tingidas covalentemente com o corante Remazol Azul Brilhante (RBB R), um derivado antraquinônico. Outros substratos celulósicos, como o papel de filtro Whatman n.1, algodão hidrófilo, bagaço de cana e celulose micro-cristalina (Avicel®) também foram tingidos e avaliados como fontes alternativas de celulose vegetal.

A produção de complexos enzimáticos celulolíticos mais eficientes, enzimas com custos reduzidos, e doses mais baixas de enzimas para obtenção de glucose livre a partir de resíduos industriais lignocelulósicos, são as palavras-chave para tornar o bioetanol um combustível viável e competitivo. Assim como novas ferramentas analíticas como a CB Azure-RBB são desejáveis para detecção e mensuração de atividade enzimática de modo mais rápido e prático.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO PRINCIPAL

Monitorar a atividade de enzimas do complexo celulolítico utilizando celulose bacteriana covalentemente tingida com o corante Azul Brilhante de Remazol R.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar e cultivar *Gluconacetobacter xylinus* a fim de obter membranas de celulose bacteriana;
- Cultivar cepa padrão de *Gluconacetobacter xylinus* em meio caldo Alabama modificado contendo fruto-oligossacarídeos, comparativamente a cultivos contendo sacarose, glucose e frutose;
- Purificar a celulose bacteriana utilizando solução aniônica;
- Caracterizar a celulose bacteriana por espectroscopia por reflexão total atenuada (ATR) no infravermelho médio;
- Corar as membranas de celulose bacteriana, e outras fontes de celulose vegetal utilizando o corante Azul Brilhante de Remazol R;
- Incubar as diferentes fontes de celulose, tingidas ou não, com enzimas do complexo celulolítico, de modo a otimizar o processo de hidrólise parcial e total através de planejamento fatorial;
- Incubar a celulose bacteriana comparativamente ao papel de filtro Whatman n.1, tingidos ou não, a fim de determinar o potencial de sacarificação das enzimas celulolíticas;
- Mensurar a quantidade de açúcar redutor com o método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), e correlacionar com a leitura direta do incubado tingido por espectrofotometria no visível por teste estatístico de correlação de Pearson e teste t ;

- = Monitorar através de Cromatografia em Camada Delgada (CCD) e densitometria a atividade celulolítica das enzimas e perfil dos hidrolisados cítrico e fosfórico de inulina;
- = Determinar por técnicas espectroscópicas de ressonância magnética nuclear de núcleos de ^{13}C e ^1H , a presença de ligação covalente entre o corante Azul Brilhante de Remazol R e as unidades de anidroglicose da celulose.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 COMBUSTÍVEIS

As diferentes fontes de obtenção de energia comercial são de extrema validade para a atual sociedade. Muitos dos produtos fabricados a partir do refino ou craqueamento do petróleo, como o gás natural, gasolina, querosene, diesel, óleos combustível e lubrificante, entre outros, são combustíveis utilizados pelos mais diferentes meios de transporte mundiais (ALMEIDA,2009; MCMILLAN,1997; STICHNOTHE,2009).

A Organização de Países Exportadores de Petróleo (OPEP), criada em setembro de 1960, hoje é composta por doze países (Angola, Arábia Saudita, Argélia, Emirados Árabes, Equador, Iran, Iraque, Kuwait, Líbia, Nigéria, Qatar e Venezuela) que juntos possuem 79% das reservas de petróleo mundiais, como vemos no GRÁFICO 1, o que representa mais de mil bilhões de barris (159 mil bilhões de litros) (OPEC,2010).

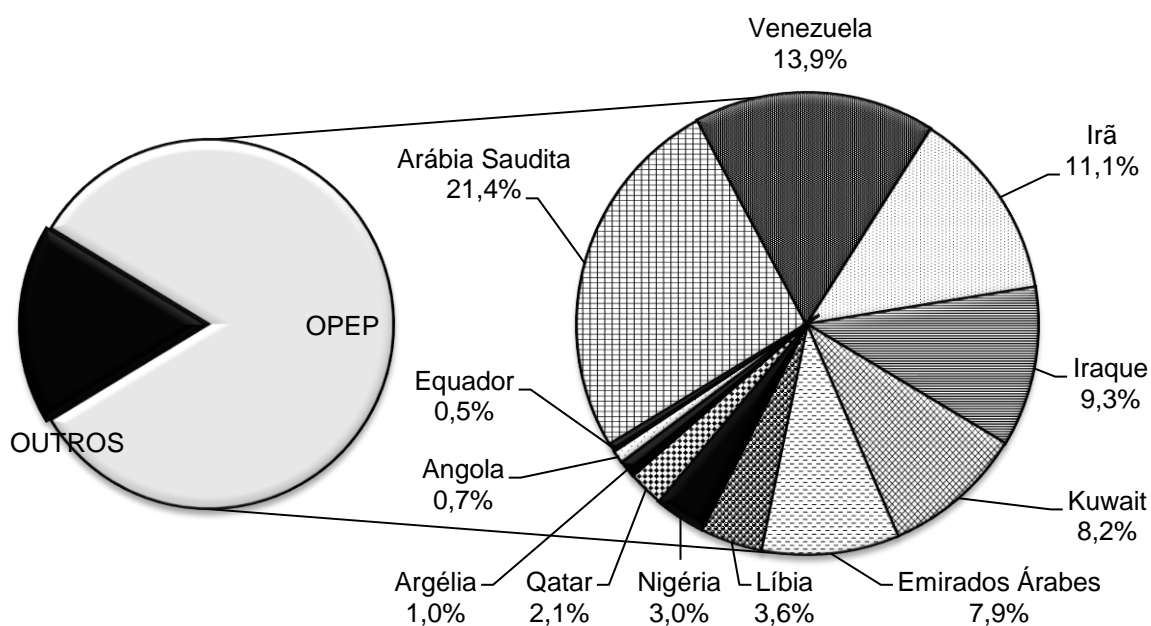


GRÁFICO 1 - ESTATÍSTICA DAS RESERVAS DE PETRÓLEO MUNDIAIS PARA OS PAÍSES DA OPEP NO ANO DE 2008
FONTE: (OPEC,2010)

No relatório mensal do mês de abril de 2010, a OPEP já esperava um aumento no consumo global de cerca de 950 mil barris/dia no ano de 2010, resultando num consumo diário total de 86 milhões barris, sendo os países da organização responsáveis por suprir em torno de 40% da demanda (CAMPOS,2010).

Existem diversos estudos sobre a taxa de produção de petróleo no mundo. Nos Estados Unidos houve um declínio de 25% na produção entre os anos de 1985 e 1995, enquanto a demanda no país dobrou no mesmo período. Apesar disso, diversos estudos afirmam que nos próximos anos a produção atingirá o seu máximo e então começará um intenso declínio, com taxa calculada pela agência internacional de energia (AIE) em 4,5% ao ano, com consequências econômicas negativas principalmente para a indústria. Esse fenômeno é conhecido como o "pico do petróleo" (*Peak Oil*). Se este cenário se confirmar, refletirá em sérios problemas econômicos e sociais, devido ao pouco tempo para busca de novas alternativas para a completa substituição do petróleo em extinção (ALMEIDA,2009; CAMPOS,2010; HEINBERG,2010; MCMILLAN,1997).

A descoberta de novos campos de petróleo caiu desde 1964, e agora a busca por petróleo é feita em águas ultra-profundas, em regiões polares ou em países politicamente fragmentados. A mais recente descoberta foi no Brasil, com o gigantesco campo de petróleo Tupi na bacia de Campos/RJ, que, juntamente com as bacias Guarará, Iara e Parque das Baleias integram o macro-complexo petrolífero chamado de "pré-sal", que possui cerca de 110 mil km² e se estende desde o Espírito Santo até Santa Catarina. A estimativa é que a Petrobrás pode chegar a produzir nestas áreas um total de 14 bilhões de barris, o que corresponde às atuais reservas de petróleo no Brasil. Se isto se confirmar, o País dobra seu volume de reservas, ultrapassando outros países como Catar, China e Estados Unidos (HEINBERG,2010; PETROBRAS,2011; SUAPESQUISA,2010).

A queda na taxa de extração do petróleo mundial entre os anos de 2005 e 2008 trouxe como consequência a ascensão do preço do barril como vemos no GRÁFICO 2, chegando ao ápice no ano de 2008, quando o preço passou de US\$ 90/barril. Contraditoriamente, este período coincidiu com o recorde mensal da produção mundial de petróleo bruto, em julho de 2008 (HEINBERG,2010).

A resposta econômica com o disparo do preço do petróleo foi rapidamente percebida, já que os produtos fósseis representam 81% da energia comercial consumida no mundo, sendo destes, 98% representados por combustíveis. A indústria global da aviação, companhias automobilísticas e a navegação mundial sucumbiram. Essa crise levou a queda da procura do petróleo e conseqüentemente do preço, mas isso pode ter sido temporário, já que o preço do petróleo voltou a subir, quase ao ponto de comprometer a recuperação econômica (ALMEIDA,2009; HEINBERG,2010).

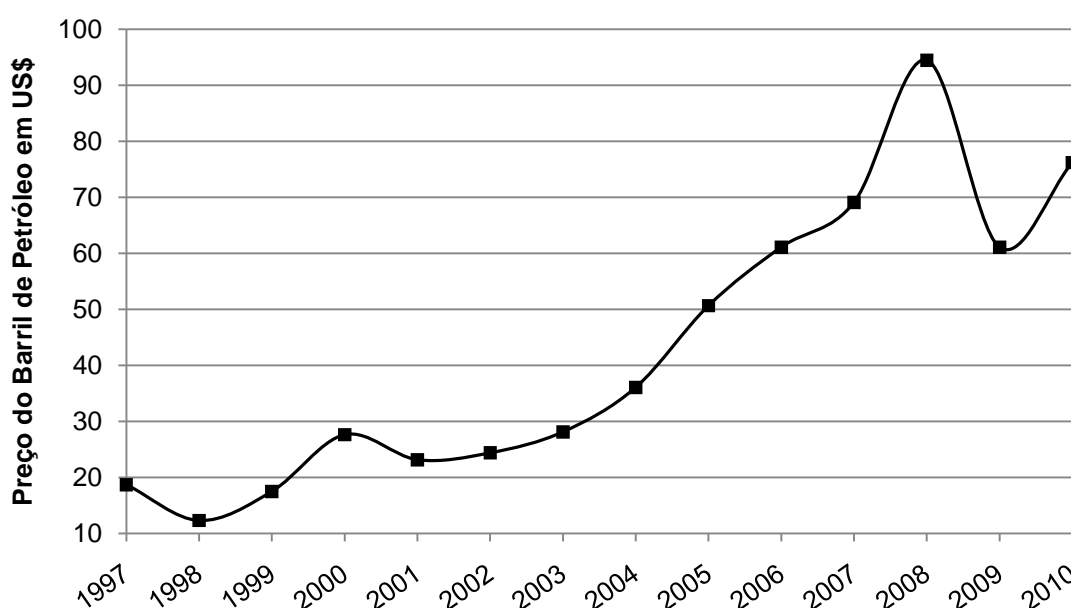


GRÁFICO 2 - EVOLUÇÃO DO PREÇO DO BARRIL DE PETRÓLEO ENTRE OS ANOS DE 1997 E 2010
FONTE: (OPEC,2010)

Todas essas perspectivas com relação ao futuro do petróleo levam à dúvida do que pode ser concretamente feito para solucionar o problema. O primeiro passo é reconhecer a realidade dos limites da oferta mundial de petróleo, já que esta matéria-prima é finita. E, portanto, é necessário estudar sistemas menos dependentes, o que leva à necessidade da busca de combustíveis alternativos produzidos através de fontes renováveis de energia (HEINBERG,2010).

3.2 BIOCOMBUSTÍVEIS

Deixando de lado toda a problemática envolvendo a demanda e preço do petróleo, seus combustíveis derivados são os maiores contribuintes para o efeito estufa devido à emissão de dióxido de carbono durante a combustão, além de outros gases ainda mais nocivos com SO_2 e SO_3 . Por este motivo existem numerosas estratégias, com benefícios ambientais, no desenvolvimento e estímulo do uso de biocombustíveis, assim definidos como aqueles derivados da (fito)biomassa renovável. Além do mais, o aumento da produção de biocombustíveis, significa a redução da demanda de combustíveis produzidos a partir de fontes finitas, como é o caso da União Européia, que pretende até o final de 2015 substituir 20% dos petrocombustíveis tradicionais por biocombustíveis (CHANG,2010; MCMILLAN,1997; STICHNOTHE,2009).

Atualmente, os biocombustíveis são produzidos a partir de culturas alimentares, como cana-de-açúcar, milho, beterraba e soja. De acordo com a agência internacional de energia (AIE), os Estados Unidos produziram em 2007, 24,4 bilhões de litros de bioetanol (produzido a partir de resíduos lignocelulósicos) e 1,8 bilhões de litros de biodiesel, em grande parte à base de milho e soja, respectivamente (CHANG,2010; STICHNOTHE,2009).

Esses biocombustíveis são seguros e biodegradáveis, e possuem a grande vantagem de produzirem menos poluentes atmosféricos que os derivados do petróleo, como a redução da chuva ácida causada a partir de SO_2 e SO_3 . O bioetanol e o biodiesel geram mais óxidos de nitrogênio (NO_x), porém menos hidrocarbonetos recalcitrantes, monóxido (CO) e dióxido (CO_2) de carbono, material particulado, sulfuróxidos (SO_x) do que os combustíveis convencionais, gasolina e diesel, representando respectivamente, cerca de 15-25% de redução de CO_2 a partir de bioetanol e até 60% a partir de biodiesel (CHANG,2010).

3.2.1 Etanol e bioetanol

O programa nacional do álcool, o Pro-Álcool, foi implementado em 1975 e é responsável pelo impressionante aumento de produção de etanol no Brasil, de 500 milhões de litros, para aproximadamente 28 bilhões de litros, em 2008/09, exclusivamente da fermentação do caldo da cana-de-açúcar. Como se pode observar no GRÁFICO 3, no mesmo período houve um proporcional aumento da produção de cana-de-açúcar, sendo que em 2009 a produção foi estimada em 570 milhões de toneladas. O processamento da cana fresca para extração do caldo gera 12% de resíduos (71 milhões de toneladas), o bagaço de cana. Este resíduo possui grande potencial de produção de bioetanol, pois é composto de cerca de 50% (35,5 milhões de toneladas) de celulose, o restante é composto por hemicelulose (30%) e lignina (20%) (UNICA,2010; ZANIN,2000).

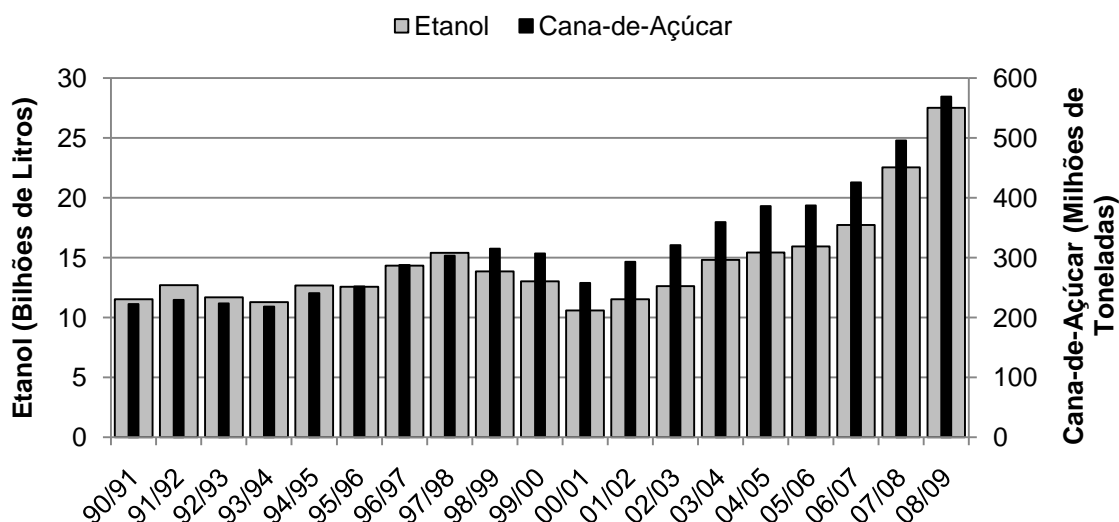


GRÁFICO 3 - EVOLUÇÃO DA PRODUÇÃO DE ETANOL E CANA-DE-AÇÚCAR NO BRASIL ENTRE OS ANOS 1990 E 2009
FONTE: (UNICA,2010)

A produção mundial de etanol não está distribuída uniformemente. A produção mundial durante o ano de 2009 chegou a 90 bilhões de litros, sendo os Estados Unidos e o Brasil os países que mais contribuem, produzindo 51,92% e 37,34%, respectivamente, seguidos pela União Européia 4,23%, China 2,90%, Canadá 1,37%, Tailândia 0,52%, Colômbia 0,46%, Índia 0,38% e Austrália 0,15%,

como é possível observar no GRÁFICO (HAMAIDE-REUTERS,2008; RFA,2010; UNICA,2010).

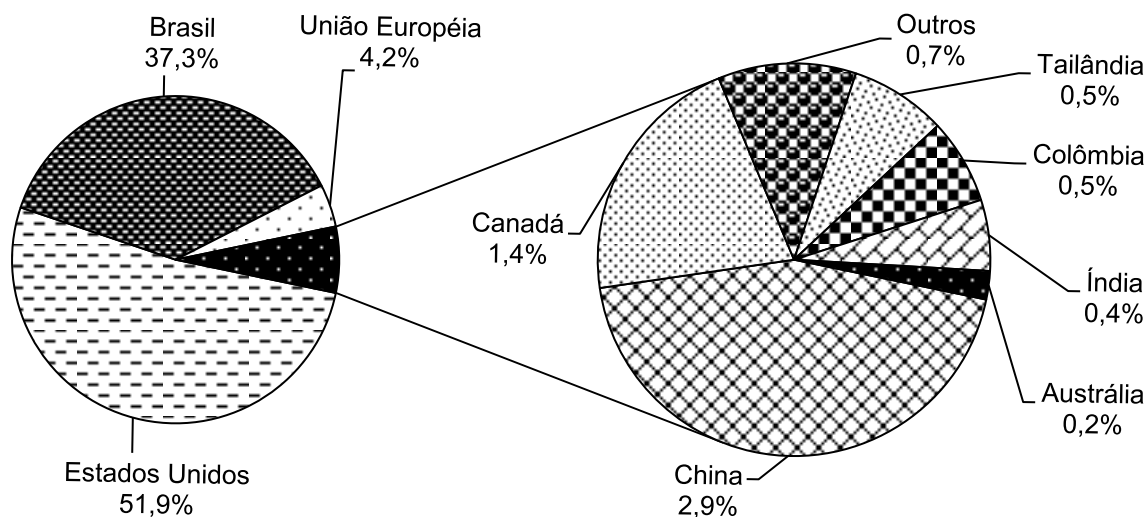


GRÁFICO 4 – PORCENTAGEM DA PRODUÇÃO DE ETANOL POR ANO
FONTE: (HAMAIDE-REUTERS,2008; RFA,2010; UNICA,2010)

O etanol pode ser produzido a partir de diferentes matérias-primas, como cana-de-açúcar, milho e inclusive de petróleo (a partir da hidratação de eteno), e é usado principalmente como combustível (68%), além de ter o uso para a produção de bebidas e na indústria farmacêutica. Já o etanol feito a partir de resíduos, o chamado bioetanol, é utilizado principalmente como combustível (ZANIN,2000).

O etanol tem toxicidade relativamente baixa e é miscível com água em qualquer proporção. A substituição de gasolina por etanol reduziria substancialmente emissões de dióxido de carbono durante a queima. Outra alternativa é a blenda de etanol com gasolina, como feito no Brasil, com a vantagem de aumentar a octanagem do combustível, não havendo mais necessidade do uso de metais pesados como o chumbo (Pb). Nove milhões de automóveis, usando 24% de etanol na gasolina, representam uma economia de até 400 milhões de barris de petróleo/ano (MCMILLAN,1997; STICHNOTHE,2009; ZANIN,2000).

A produção de etanol ocorre em quatro gerações. Na primeira o etanol é produzido a partir da sacarose do caldo de cana-de-açúcar. As próximas gerações compreendem a produção de bioetanol, como pode ser visto no esquema apresentado na FIGURA 1. A segunda geração é a produção a partir de açúcares

produzidos pela hidrólise ácida do substrato. Já terceira compreende ao uso de açúcares obtidos a partir de hidrólise enzimática. A quarta geração compreende uma integração de todas as gerações anteriormente citadas (BUCKERIDGE,2011).

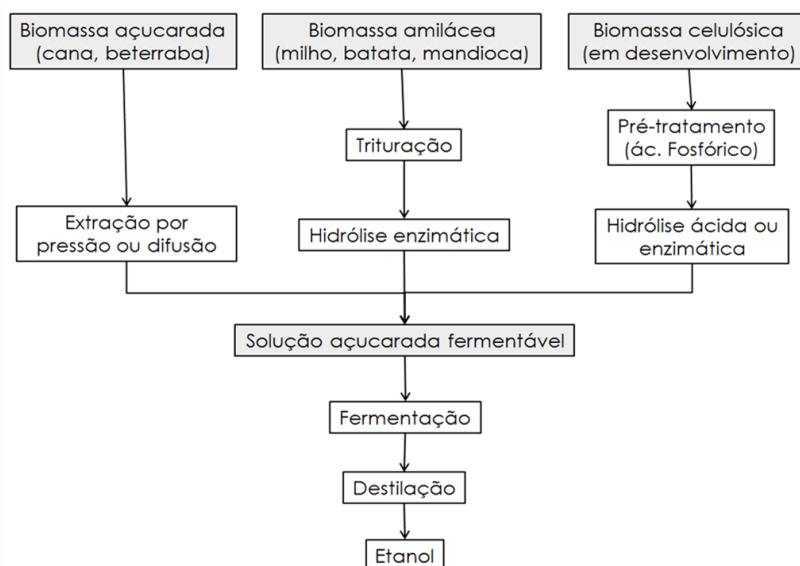


FIGURA 1 - ESQUEMA DE PRODUÇÃO DE ETANOL A PARTIR DE DIFERENTES MATÉRIAS-PRIMA
FONTE: adp. (BNDES,2008)

Os materiais lignocelulósicos são particularmente atraentes para produção de bioetanol devido a seu custo relativamente baixo e a oferta abundante. O Departamento de Energia Norte Americano (DOE) está promovendo programas de desenvolvimento de produção de bioetanol a partir desses resíduos, principalmente de milho, visando desenvolver melhorias no processo de hidrólise e fermentação. Como podemos ver na FIGURA 2, os Estados Unidos já possuem 26 projetos em desenvolvimento e/ou construção de usinas para produção de bioetanol por diferentes processos de hidrolíticos, além de diversos centros dedicados a pesquisa para o avanço da comercialização deste produto, indicando a entrada deste no mercado americano nos próximos anos (LYND,2002; MCMILLAN,1997; RFA,2010; ROEHR,2001).

No Brasil, o Ministério de Ciência e Tecnologia inaugurou o Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol (CTBE), que está voltado a manter a liderança nacional na produção sustentável de etanol a partir da cana-de-açúcar. Este laboratório foi construído dentro complexo do Centro Nacional de Pesquisas em Energia e Materiais - CNPEM, localizado em Campinas-SP, o qual apóia, com

sofisticada infra-estrutura, as pesquisas em nível molecular (BNDES,2008; UNICA,2010).

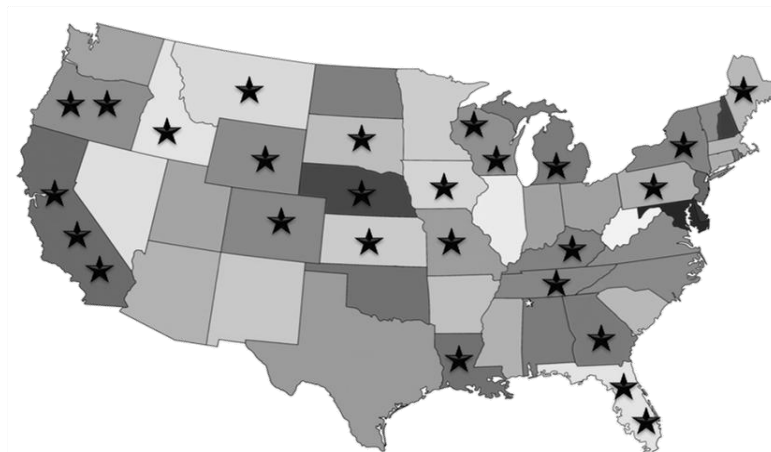


FIGURA 2 - PROJETOS EM DESENVOLVIMENTO/CONSTRUÇÃO DE PRODUÇÃO DE BIOETANOL NOS ESTADOS UNIDOS
FONTE: ADP. (RFA,2010)

O Bioetanol, quando adequadamente destilado, não possui nenhuma diferença físico-química quando comparado ao etanol, já que o açúcar (glucose) liberado durante processo de hidrólise da celulose passa pelo mesmo processo fermentativo do caldo de cana-de-açúcar (glucose e frutose), ou da glucose liberada após hidrólise enzimática do amido de milho nos Estados Unidos. A levedura utilizada, *Saccharomyces cerevisae*, é essencialmente a mesma, exceto por detalhes de seleção genética. As atuais pesquisas de grandes multinacionais, como a Novozymes® e a Genencor®, já reduziram o custo industrial das enzimas celulolíticas de US\$ 0,50 para US\$ 0,20, por galão (3,78 L) de bioetanol produzido. Mas para se tornar competitivo, o custo deve ser de no máximo US\$ 0,04. Portanto a fabricação do bioetanol a partir de resíduos lignocelulósicos envolve maior redução de custos, seja na produção de enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas mais eficientes ou no desenvolvimento de processo contínuo (sacarificação e fermentação simultaneamente). A consolidação destes dois passos poderá reduzir o custo do processo global (GOHO,2010; LYND,2002).

3.3 CELULOSE

A alta produção mundial de resíduos celulósicos se deve ao fato da celulose ser a mais abundante das biomoléculas, sendo o maior componente da biomassa vegetal, mais precisamente da parede celular. Dependendo do tipo da planta e do seu estágio de crescimento, 35-50% do seu peso seco é composto por celulose, 25-35% de hemicelulose e 20-30% de lignina (LYND,2002).

A celulose é composta por milhares de unidades de β -D-glucopirranose, cerca de dez a quinze mil, unidas por ligação covalente tipo β 1 \rightarrow 4. Cada resíduo de glucose tem uma orientação de 180° em relação ao resíduo adjacente, acomodando desta forma os ângulos de ligação preferidos pelos grupos acetais em ligações de hidrogênio, formando assim a celobiose, a subunidade repetitiva do polímero celulose, como vemos na FIGURA 3. A extremidade da cadeia em que se encontra o resíduo de glucose, cujo carbono anomérico está livre é chamada de extremidade redutora, e a extremidade oposta é chamada de não-redutora (NELSON,2006; SANDGREN,2005).

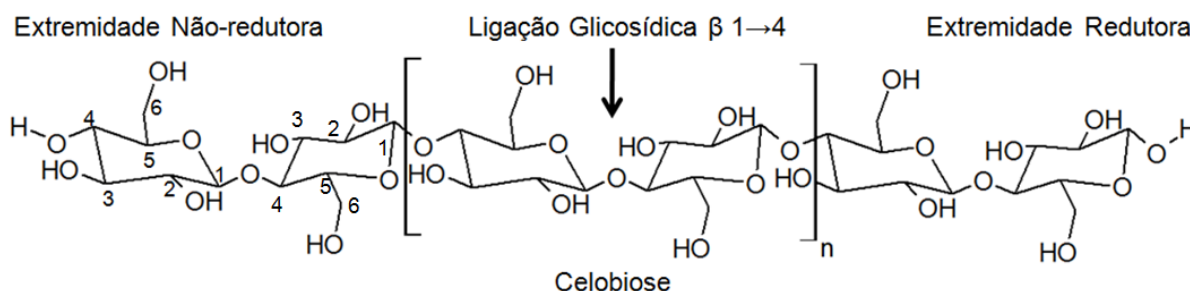


FIGURA 3 - ESTRUTURA MOLECULAR DA CELULOSE, CELOBIOSE E LIGAÇÃO β -GLICOSÍDICA
NOTA: Resíduos de anidrogucose da extremidade não-redutora com os carbonos numerados.

Na natureza, a celulose é sequencialmente sintetizada como moléculas individuais. O comprimento das cadeias depende do grau de polimerização (GP), que varia de acordo com a origem. Estas cadeias lineares de resíduos de anidrogucose submetem-se a automontagem no local da biossíntese. Aproximadamente 30 destas moléculas individuais são fisicamente entrelaçadas em unidades maiores, as micro-fibrilas, que são estabilizadas com hemiceluloses, heteroxilanas (madeiras duras, angiospermas e gramíneas) ou heteromanas

(madeiras moles ou gimnospermas), através de múltiplas ligações de hidrogênio e forças de Van der Waals, formando as fibrilas. Estas ligações de hidrogênio resultam da distribuição não uniforme dos elétrons das ligações da celulose, gerando um momento dipolo permanente na molécula. A atração dipolo-dipolo entre os átomos de hidrogênio e os átomos de oxigênio, fortemente eletronegativos, é muito forte, porém mais fraca que a ligação covalente (LYND, 2002; NELSON, 2006; (FONTANA,2004a; SOLOMONS,2001).

Na maioria dos vegetais a fração hemicelulose se compõe de uma mistura heterogênea de polissacarídeos dentre os quais se destacam as xilanas, mananas, galactanas e arabinanas. A hemicelulose mantém interações covalentes com as moléculas de lignina, polímero aromático heterogêneo, fornecendo à parede celular rigidez e proteção contra patógenos e também contra o ataque de microrganismos hemi-celulolíticos (PÉREZ,2001; SANDGREN,2005).

As unidades de D-glucose, assim como as diferentes fibrilas de celulose interagem intimamente entre si, formando a estrutura cristalina da celulose, através de ligações de hidrogênio internas e externas. Cada camada adjacente de celulose é ainda unida por forças de Van der Waals, o que resulta em fibras compactas completamente insolúveis em água, embora sejam hidratáveis (FONTANA,2004b; LYND,2002; SAXENA,2001).

A natureza cristalina da celulose implica em uma estrutura ordenada em que todos os átomos são fixados em posições exatas em relação aos outros. Uma característica importante da matriz cristalina é que as moléculas que compõem as micro-fibrilas são compactadas suficientemente bem para evitar a penetração não só por enzimas, mas até mesmo por pequenas moléculas, como da água. Porém as fibras de celulose na natureza não são puramente cristalinas, pois são intermediadas por regiões menos compactas, chamadas amorfas, em que as fibras apresentam maior distância uma das outras, como exemplificado na FIGURA 4. Além do volume cristalino e das regiões amorfas, as fibras de celulose contêm vários tipos de irregularidades, como dobras ou torções das micro-fibrilas, ou lacunas, tais como micro-poros na superfície. O efeito líquido da heterogeneidade estrutural é que as fibras são pelo menos parcialmente hidratadas quando imersas em meio aquoso, e alguns micro-poros e capilares são suficientemente espaçosos para permitir a

penetração de moléculas relativamente grandes, incluindo as enzimas celulolíticas (FONTANA,2004b; LYND,2002; SAXENA,2001).

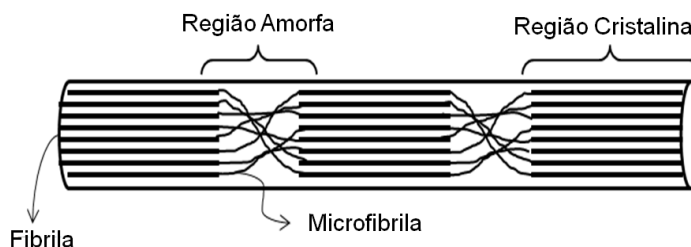


FIGURA 4 - ESTRUTURA SUPRAMOLECULAR DAS FIBRILAS DE CELULOSE
FONTE: adp. (LYND,2002)

A utilização de celuloses purificadas para estudos de hidrólise por enzimas de microrganismos pode levar a grandes diferenças de eficácia, devido a essas diferenças estruturais. Existem as holoceluloses (Solka Floc®), que são produzidas principalmente da deslignificação da madeira. Este material contém quantidades substanciais de diferentes hemiceluloses e muitas vezes uma densidade baixa, levando ao inchaço das fibras de celulose. A celulose micro-cristalina (Avicel®/Sigmacell®) é praticamente composta de celulose pura. O tratamento com soluções ácidas moderadamente enérgicas remove tanto hemiceluloses quanto regiões amorfas mais extensas. As diferentes celuloses micro-cristalinas comerciais diferem principalmente na distribuição do tamanho das partículas (moléculas), que tem implicações significativas para a taxa de hidrólise. Elas possuem GP baixo relativamente à celulose, na ordem de 150 a 300 unidades de monômeros (LYND,2002).

A utilização de biomassa celulósica, como o bagaço de cana-de-açúcar, é mais complexa do que utilizar a celulose pura, não só devido a composição (presença de hemicelulose, lignina e pectina), mas também porque tecidos vegetais diferem enormemente no que diz respeito à armação molecular e organização supramolecular. No algodão e outras plantas fibrosas, os valores de GP estão na ordem de 800 a 10.000, dependendo do tratamento físico ou extrativo. Alguns tipos de células vegetais têm paredes finas, pouco lignificadas, que são mais facilmente degradadas por enzimas celulolíticas. Outros têm a espessura das paredes celulares e lamela média altamente lignificadas, sendo que estas paredes devem ser atacadas de dentro para fora, através da parede secundária (LYND,2002).

Assim, além de restrições impostas pela estrutura da celulose em si, as limitações adicionais são impostas por difusão e transporte do agente celulolítico (ácidos ou enzimas) ao local do ataque. A celulose é um material relativamente difícil de hidrolisar até glucose, mas que, por sua vez, é facilmente fermentada a etanol, por exemplo. Comparada com o amido, a celulose possui muito mais regiões cristalinas, que para se converterem para o estado amorfo, mais fácil de ser hidrolisado, requer temperatura e pressão elevadas (320°C e 25 MPa). Já o amido, com um rápido cozimento em água, com temperatura de 60-70°C, já passa completamente para o estado amorfo (ROEHR,2001).

A complexidade estrutural das diferentes celulosas, mesmo puras, e a dificuldade de trabalhar com esse substrato insolúvel, levam à ampla utilização de celulosas altamente solúveis, como a carboximetilcelulose (CMC), substrato para estudos na indução e produção de endo-glucanases, primeiro sub-grupo de enzimas do complexo celulolítico. Infelizmente, o uso de CMC como um substrato enzimático enfraqueceu o sentido do termo "celulolítica", já que muitos organismos que não degradam celulose podem hidrolisar CMC via enzimas do tipo β -glucanas (LYND,2002).

A celulose sintetizada por bactérias tem sido extremamente útil como sistema modelo para o estudo da biossíntese e degradação de celulose. Assim como a celulose vegetal, a bacteriana é altamente cristalina, porém difere no arranjo das unidades de anidrogucose na cela unitária dos cristais, além de provas genéticas sugerirem que são sintetizadas por maquinários enzimáticos consideravelmente diferentes ao nível molecular. As duas celulosas também diferem substancialmente na taxa de hidrólise por enzimas celulolíticas (LYND,2002).

Os diferentes arranjos de ligações de hidrogênio inter e intra-moleculares origina vários tipos de estruturas cristalinas. Quatro principais foram identificadas pelas características de difração de raios-X. Caracterizando a ultra-estrutura destes arranjos de celulose, observa-se ainda a classificação em sub-grupos (DUMITRIU,1998).

A forma natural de celulose, chamada de celulose I, é a mais abundante. Estudos de ressonância magnética nuclear (RMN) de núcleos de ^{13}C com técnica de polarização cruzada em rotação do ângulo mágico (CP-MAS) mostram que a celulose I possui dois tipos de arranjo cristalino, chamados de fases Ia e Ib. A

ocorrência dessas fases varia de acordo com a fonte de celulose, sendo que se produzida por organismos primitivos, como algas e bactérias, são formadas basicamente pela forma I α enquanto a celulose produzida por plantas superiores e alguns animais marinhos são essencialmente I β (PÉREZ,2001).

A celulose do tipo cristalino I α tem unidade de cela triclinica, com ocorrência de ligações de hidrogênio intra-molecular O3H \rightarrow O5' (azul) e inter-molecular O6-H \rightarrow O3' (rosa). Já a celulose I β com unidade de cela monoclinica faz ligação de hidrogênio preferencialmente entre O6 \rightarrow H-O2' intra-molecular (verde) e inter-molecular (vermelho) como podemos comparar na FIGURA 5. A celulose I α e I β podem se inter-converter durante a formação da fibra, e a I α ainda pode passar a I β durante tratamento térmico (JARVIS,2000; PÉREZ,2001).

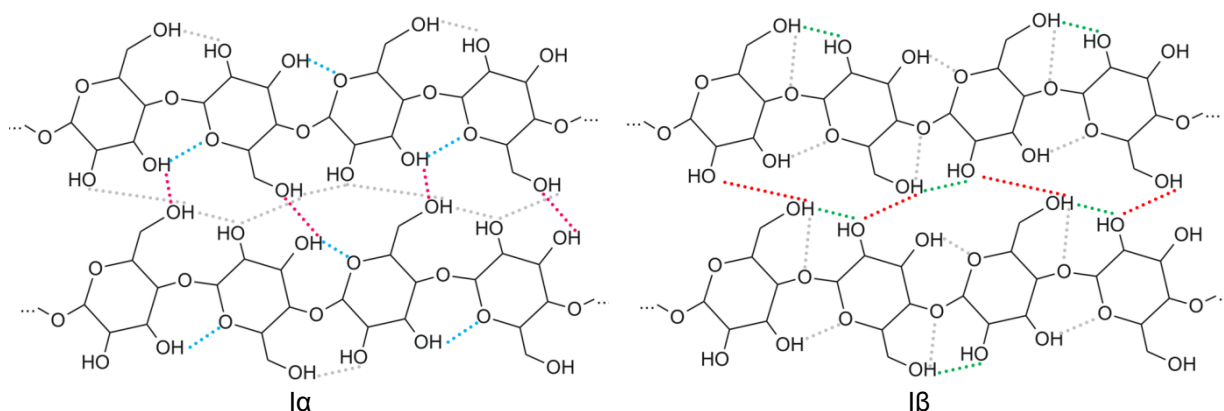


FIGURA 5 - ARRANJO DAS LIGAÇÕES DE HIDROGÊNIO NA CELULOSE DE TIPOS CRISTALINOS I α E I β

NOTA: I α - ligações de hidrogênio intra-molecular O3H \rightarrow O5' (azul) e inter-molecular O6-H \rightarrow O3' (rosa). I β - ligação de hidrogênio O6 \rightarrow H-O2' intra-molecular (verde) e inter-molecular (vermelho).

FONTE: adp. (JARVIS,2000)

A celulose tipo II possui arranjos das ligações de hidrogênio entre as fibras do tipo anti-paralelo. O tipo I pode se converter irreversivelmente para o tipo II, sugerindo a maior estabilidade do último. Esta celulose pode ser produzida a partir do tipo I por reação com hidróxido de sódio aquoso, ou pela dissolução da celulose e subsequente recristalização, como é feito para a formação de filmes de fibras (DUMITRIU,1998; PÉREZ,2001).

Diversos tratamentos químicos produzem as celulosas tipo III e IV, principalmente para uso têxtil. A primeira é obtida por mercerização da celulose I com amônia, que impregna os tecidos de algodão, provocando contração dos fios, dando-lhes um brilho sedoso. A celulose tipo III é similar ao tipo II, porém possui

cadeias paralelas. Esta reação produz celulose III₁ e III₂ dependendo se foram originadas de I α ou I β . O tipo IV é obtido através de tratamento com altas temperaturas e glicerol, a partir do tipo III, originando IV_I e IV_{II} (DUMITRIU,1998; JARVIS,2000; PÉREZ,2001).

Para determinar as características da estrutura supra-molecular e o tamanho das áreas cristalinas da celulose foi utilizada técnica de RMN ¹³C, CP-MAS, uma vez que estas influenciam significativamente nas propriedades físico-químicas do material. Quanto mais cristalino o arranjo da celulose, pode-se observar nos espectros, regiões menos ordenadas referentes aos carbonos C4 e C6. O sinal de C4, apesar de bem resolvido, desloca para campos próximos a 90-80 ppm. Então se houver dois sinais de 84 e 89 ppm, estes são atribuídos a amostras não-cristalinas e cristalina, respectivamente (ZUCKERSTÄTTER,2009).

Além da problemática envolvendo o processo celulolítico, a química de carboidratos ainda apresenta dificuldades quando o assunto é a reação em grupos OH específicos e a seletividade destes. No caso da celulose, a diferença na reatividade entre o grupo hidroxila do C6, conforme numeração representada na FIGURA 3, altamente acessível, e as hidroxilas secundárias dos C2 e C3, mais ácidas e próximas à função acetal, são obscurecidas pelas diferentes formações de ligações de hidrogênio entre as cadeias (CLASEN,2001).

3.3.1 Celulose Bacteriana

Um certo número de microrganismos são capazes de sintetizar celulose, como é o caso da bactéria *Gluconacetobacter xylinus*. Embora sequências similares à celulose sintase, principal enzima produtora de celulose, de *G. xylinus* serem identificadas em bactérias como a *Escherichia coli* e até mesmo no amebóide *Dictyostelium discoideum*, nenhuma produção significativa de celulose foi relatada (SAXENA,2001).

A celulose microbiana ou celulose bacteriana (CB) possui diversas vantagens quando comparada com a vegetal. Um fato interessante é que suas fibras são orientadas de forma randômica, fazendo com que ela possua diversas regiões

amorphas, levando-a a possuir rápida biodegradabilidade em solo e rápida hidrólise com microrganismos que possuam complexos celulolíticos, propriedades estas exploradas nesse trabalho (FONTANA,1997; THOMPSON,2001).

A CB é composta de celulose pura, ou seja, é desprovida de lignina, hemicelulose, pectina ou qualquer outro -presente na celulose vegetal. Esta pureza representa grande vantagem para seu uso, já que a celulose vegetal utiliza insumos químicos altamente poluidores, como gás cloro, soda cáustica e dissulfeto de carbono durante processo de purificação (FONTANA,2004a; FONTANA,1990; FONTANA,1997).

Devido a seu processo de biosíntese ser de forma linear, a CB possui 200 vezes mais área de superfície que a celulose vegetal, além de sua força elástica ser comparada a do aço. Esta característica somada à alta capacidade de hidratação, apesar de insolúvel, faz com que o substrato seja ideal para produção de diversos produtos de alto valor agregado, como *pellets*, membranas filtrantes de uso especial e pele artificial, utilizada como substituto temporário no tratamento de queimaduras e outras injúrias dérmicas (FONTANA,1990; THOMPSON,2001; TODA,1997).

Além do mais, a CB possui um alto potencial comercial em produtos como diafragmas sensíveis para fones de ouvido estéreo, aditivos para produtos alimentares como suplemento de fibra dietética, indústrias de papel e têxtil, espessantes para tintas, entre outros (FONTANA,1990; LEE,1999; VANDAMME,1998).

A morfologia das membranas é diretamente dependente da forma da interface meio-ar, podendo facilmente ser manipuladas, de acordo com o formato do frasco utilizado para o cultivo. As propriedades físico-químicas também podem ser controladas por mudanças nas condições de crescimento. Podem ser adicionados ao meio, por exemplo substâncias que causem alterações físicas e/ou químicas, dando as membranas outras funcionalidades, como o uso de CB em sistemas de encapsulamento para os tecidos vivos, viáveis sistemas celulares ou proteínas enzimáticas (SOKOLNICKI,2006).

3.4 *Gluconacetobacter xylinus*

Em 1985, Yamada e Kondo descrevem para o gênero *Acetobacter*, o sub-gênero *gluconoacetobacter*. Em 1996, Toyosaki *et al.*, confirmaram que este sub-gênero é composto por dois grupos filogenéticos, sugerindo a divisão. Foram sugeridos os sub-gêneros, *gluconoacetobacter* e *sucrofermentans* (LPSN,2011). Porém, em novo trabalho de Yamada *et al*, em 1998, trinta e seis cepas de bactérias acéticas, classificadas nos gêneros *Acetobacter*, *Gluconobacter* e *Acidomonas* foram examinadas para suas sequências de bases parciais. O estudo concluiu que as estirpes classificadas no sub-gênero *gluconoacetobacter* do gênero *Acetobacter* são filogeneticamente muito distantes das espécies de *Acetobacter* e/ou *Gluconobacter*, indicando que estes podem ser distinguidos a nível genético. Por esse motivo, um novo gênero foi proposto na classificação das bactérias do ácido acético, o *Gluconacetobacter* (YAMADA,1997), sendo este validado na lista n. 64 de publicação de novos nomes de microrganismos. Nota-se que na ocasião da validação, o nome do gênero foi corrigido segundo regras de grafia de *Gluconoacetobacter* para *Gluconacetobacter* (LIST,1998). Estudos recentes de Cleenwerck *et al.* Voltam a sugerir divisão, desta do gênero, em dois, chamados *Gluconacetobacter* e *Sucrofermentans*, entretanto nenhuma alteração oficial foi publicada até então (CLEENWERCK,2010). Sendo assim, a *Gluconacetobacter xylinus* está classificada no gênero *Gluconacetobacter*, um dos 29 gêneros da família Acetobacteraceae. Faz parte da ordem Rhodospirillales, classe α -Proteobacteria, filo Proteobacteria (LPSN,2011).

A *G. xylinus*, anteriormente chamada de *Acetobacter xylinum*, é uma bactéria gram-negativa que possui como parte de seu anabolismo normal, secretar fibrilas de celulose, como mostrado na FIGURA 6. É um microrganismo obrigatoriamente aeróbico que possui pH ótimo de produção próximo a 5, sendo que esta produção está diretamente relacionada com o seu crescimento. Dentre outros motivos, a *G. xylinus* tem sido utilizada como um sistema modelo para estudos sobre a biossíntese de celulose e da estrutura dos produtos relacionados (LEE,1999; ROMLING,2002; SAXENA,2001; THOMPSON,2001).

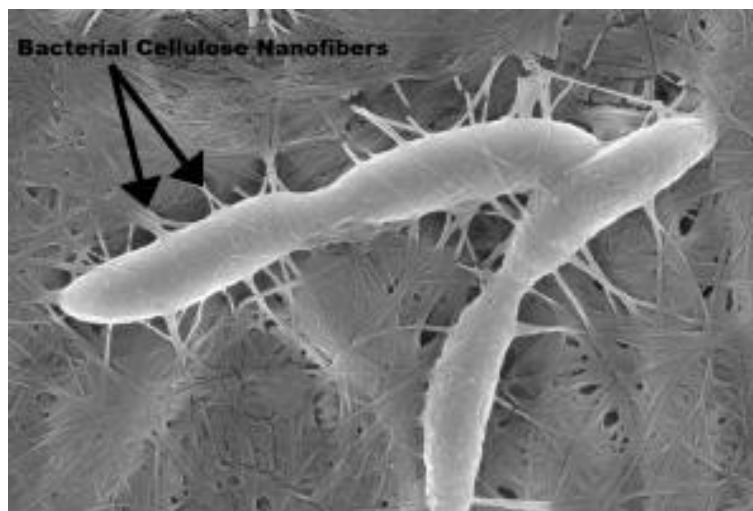


FIGURA 6 - EXTRUSÃO DE CADEIAS DE CELULOSE PELA BACTÉRIA *Gluconacetobacter xylinus*

A produção de CB pela bactéria *G. xylinus* já foi observada utilizando diferentes fontes de carbono, como sacarose, frutose, glucose, glicerol, manitol, arabinol, dentre outras, assim como em meios contendo etanol, acetato, succinato ou L-malato. Estudos mostram que as células isoladas de cultivos em etanol ou ácidos orgânicos, foram capazes de transformar os intermediários do ciclo do ácido cítrico (ciclo de Krebs) em celulose. Já em cultivos tradicionais, com açúcares, foi demonstrado que os carboidratos são oxidados por meio do ciclo das pentoses com diminuição do pH durante o crescimento, devido a produção de ácido acético, que funciona como retro-alimentação negativa de produção de celulose (GROMET-ELHANAN,1963; KORNMAN,2003; THOMPSON,2001).

A celulose é sintetizada por uma enzima designada de celulose sintase, uma proteína de membrana que cataliza a polimerização linear da glucose a partir de UDP-glucose. A cadeia de glucose se alonga progressivamente a partir da extremidade não-redutora. A regulação envolve o ácido 3,5-diguanílico cíclico (c-di-GMP), como ativador alostérico da biossíntese de celulose (segundo mensageiro) e algumas proteínas com domínio GGDEF. Esse domínio está presente nas enzimas diguanilato ciclase e fosfodiesterase, responsáveis respectivamente pela síntese e degradação da c-di-GMP. Algumas dúzias de cadeias e em algumas cepas de alta produção com até mais de 250 unidades, a celulose é produzida e se arranja de forma paralela através das ligações de hidrogênio, formando uma rede reticulada cujo diâmetro é 100 vezes menor que o das fibras de celulose encontradas na madeira (ROMLING,2002; SAXENA,2001; TODA,1997).

Já foi demonstrado que o cultivo com leve oxigenação submersa pode aumentar a produção de celulose quando utilizado micro-partículas insolúveis, como pérolas de vidro ou sílica. Estas formam microrregiões oxigenadas que levam a formação de celulose nestas partículas. Porém o cultivo é tradicionalmente realizado sem qualquer agitação, produzindo filmes flotantes (películas) na interface líquido-ar do cultivo, sendo que as bactérias, em parte, vão se impregnando na membrana produzida. Outra forma de aumentar a produção é com a adição de 2% de ácido acético no meio de cultivo, bem como a adição de 1-5% de etanol (CHÁVEZ-PACHECO,2005; TODA,1997; VANDAMME,1998).

Embora a *G. xylinus* ser a bactéria que possui maior potencial para a comercialização na indústria, os valores de produtividade de celulose são demasiados baixos para a produção em larga escala. Para a produção de 1 Kg de CB em peso seco, em um sistema sem agitação, são necessários cerca de 650 m² de área de interface ar-líquido do cultivo, por aproximadamente 5 dias de cultivo, o que torna o produto muito caro. Por esse motivo a melhoria da produtividade de celulose chama o interesse de muitos pesquisadores na tentativa de isolar microrganismos de alta produção (LEE,1999; VANDAMME,1998).

3.5 ENZIMAS CELULOLÍTICAS

As enzimas representam uma função especial das proteínas, pois estas são capazes de ligar-se a outras moléculas e as transformarem quimicamente – ou seja, servem como catalisadores de reações. Por possuírem alto grau de especificidade por seus substratos, aceleram reações químicas, com a vantagem de funcionar em soluções aquosas sob condições muito suaves de temperatura e pH (NELSON,2006).

Conhecer a estrutura tridimensional de uma proteína é importante para a compreensão do seu funcionamento, pois freqüentemente a atividade está acompanhada por mudanças conformacionais. Quatro níveis estruturais são comumente definidos. A estrutura primária é a união de resíduos de aminoácidos em uma cadeia polipeptídica, FIGURA 7, sendo o mais importante a sequência dos

mesmos. A estrutura secundária refere-se aos arranjos estáveis dos resíduos de aminoácidos, dando padrões estruturais recorrentes. A estrutura terciária descreve os aspectos do dobramento tridimensional de um polipeptídeo. Já a estrutura quaternária descreve o arranjo espacial de uma proteína que possua duas ou mais unidades polipeptídicas individuais (NELSON,2006).

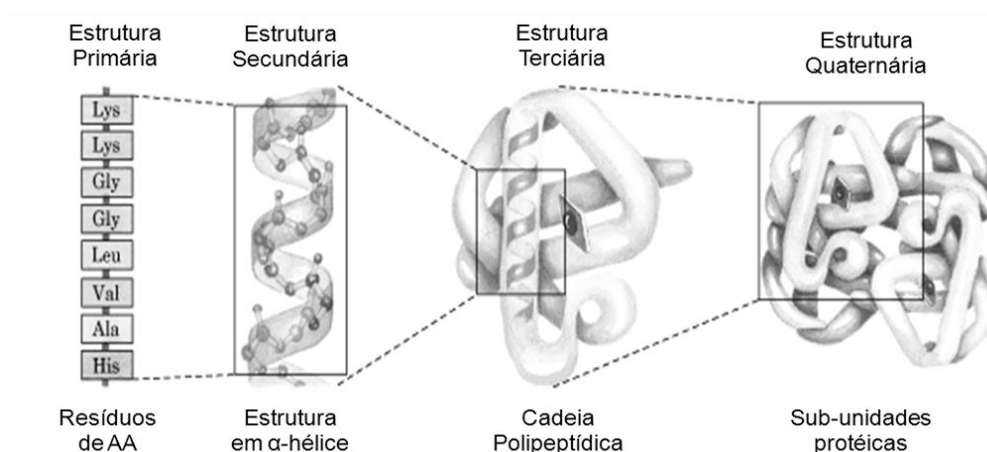


FIGURA 7 - NÍVEIS DE ESTRUTURA NAS PROTEÍNAS
FONTE: (NELSON,2006)

As enzimas celulolíticas, chamadas genericamente de celulases, ou, mais apropriadamente, de complexos celulolíticos, são enzimas capazes de hidrolisar as ligações glicosídicas β 1 \rightarrow 4 da celulose liberando como produto diversas cadeias curtas de celulose, oligossacarídeos, e ainda celobiose e glucose livre. Por esse motivo estas enzimas são produzidas por vários microrganismos, sendo que isto sugere a necessidade da capacidade de degradação de celulose, possivelmente adquirida por um antepassado primordial no início do desenvolvimento evolutivo, devido a pressão seletiva (KLYOSOV,1995; LYND,2002).

Dentre os fungos, um número de espécies do grupo *Chytridomycetes*, são bem conhecidos por degradar a celulose no trato gastrointestinal de animais ruminantes. Entre as 700 gêneros e espécies de *Zygomycetes*, apenas alguns membros do gênero *Mucor* demonstram possuir atividade significativa. As subdivisões muito mais diversificadas *Ascomycetes*, *Basidiomycetes* e *Deuteromycetes*, somando juntas mais de 15.000 espécies, contêm grande número de produtores de enzimas celulolíticas. O fungo *Trichoderma reesei* é o mais estudado para a produção de celulases. Este fungo produz pelo menos duas exo-

glucanases (CBH I e CBH II), cinco tipos de endo-glucanases (EG I-EG V) e duas β -glucosidases (BGL I e BGL II). Os diversos melhoramentos genéticos deste microrganismo resultaram em variedades que produzem até 330 mg de proteína por grama de peso seco. O processo de purificação destas enzimas envolve o fracionamento em colunas cromatográficas, o que aumenta significativamente o custo de produção destas enzimas purificadas (LYND,2002; TOMME,1988).

Entre as bactérias, há uma nítida diferença na estratégia celulolítica entre os grupos aeróbios e anaeróbios. Com relativamente poucas exceções as bactérias anaeróbias degradam celulose principalmente através de sistemas do complexo celulolítico. Enzimas celulolíticas, por exemplo, em culturas de *Clostridium thermocellum*, são normalmente distribuídas tanto na fase líquida quanto na superfície das células. No entanto, várias espécies de anaeróbios, que utilizam a celulose, não liberam quantidades mensuráveis de enzimas. A grande maioria das espécies anaeróbias que possuem enzimas celulolíticas, crescem em celulose quando ligadas a esse substrato, e pelo menos em algumas espécies a adesão deste parece ser obrigatória (LYND,2002).

Tanto os fungos quanto as bactérias utilizam a celulose através da produção de quantidades substanciais de enzimas, as quais podem ser recuperadas no sobrenadante da cultura. As diferentes enzimas do complexo celulolítico exibem forte sinergia na hidrólise de celulose, conhecidos como sistemas enzimáticos. Este sistema é composto por três modos de catálise das fibras de celulose, capazes de atacar o substrato de maneira sinérgica. Este sinergismo aumenta a eficiência de ação quando comparada a ação isolada das enzimas, como podemos observar na FIGURA 8 (KLYOSOV,1995; LYND,2002).

A classificação das enzimas celulolíticas é feita com base no modo em que cada uma catalisa a quebra das fibras de celulose:

- As endo-glucanases (EG, endo-1,4- β -glucanase ou 1,4- β -glucanohidrolases) clivam as ligações internas nas micro-fibrilas que se encontram nas regiões amorfas da fibra de celulose, diminuindo o comprimento das cadeias e gerando novas extremidades livres, redutoras e não-redutoras;
- As exo-glucanases, frequentemente chamadas de celobiohidrolases (CBH, exo-1,4- β -glucanases ou 1,4- β -D-glucana celobiohidrolases),

agem de maneira progressiva a partir das extremidades redutoras (CBH I) ou não-redutoras (CBH II) da celulose, liberando oligossacarídeos menores e principalmente celobiose. As CBH podem atuar sobre a estrutura micro-cristalina da celulose, provocando a liberação das fibras.

- As β -glucosidases (BGL, celobíases ou β -D-glicosídeo glucohidrolases) atuam nos resíduos de celodextrinas e mais intensamente na celobiose liberando glucose livre (KLYOSOV,1995; LYND,2002).

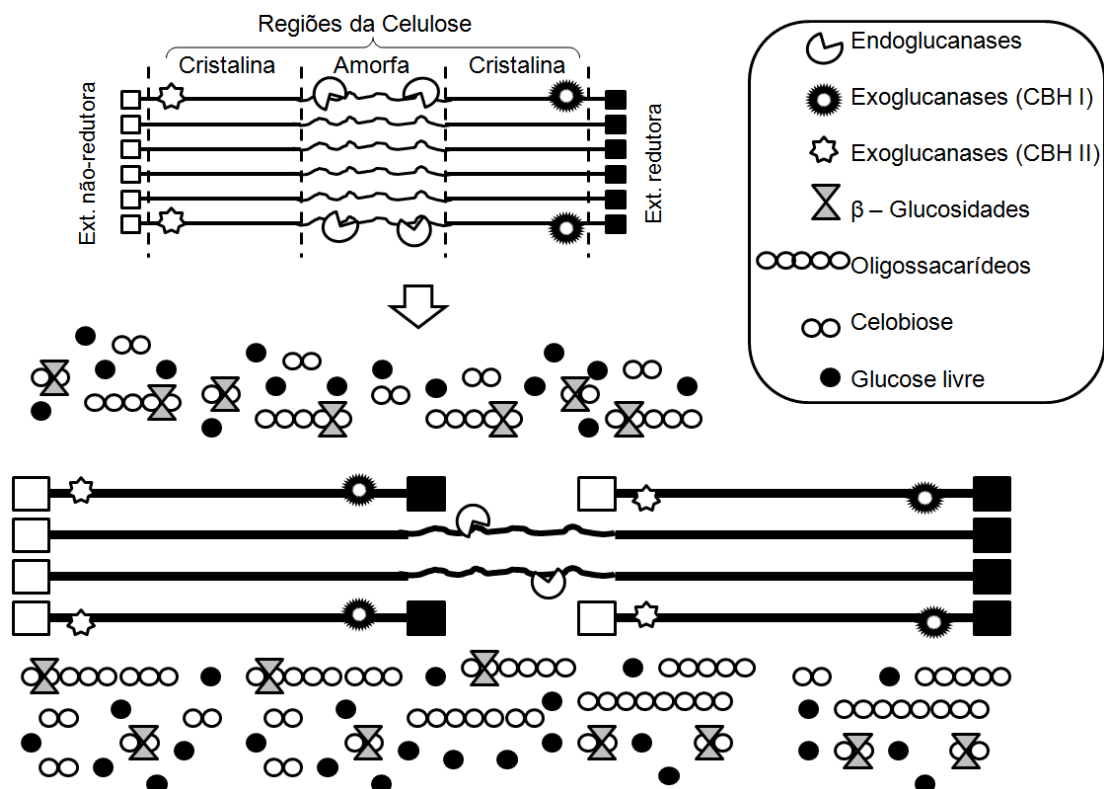


FIGURA 8 - MECANISMO DE AÇÃO DAS ENZIMAS CELULOLÍTICAS
FONTE: adp. (LYND,2002)

Embora as celulasas sejam divididas em diferentes grupos, elas possuem características em comum, obtidas durante a evolução. A estrutura modular, muitas vezes inclui dois módulos catalíticos de ligação ao carboidrato (CBMs). Nas EG elas se apresentam na forma de fenda, enquanto nas CBH possuem uma espécie de túnel que envolve a micro-fibrila de celulose. Os efeitos da ligação destes módulos

com a celulose é um estreitamento da proximidade, facilitando a hidrólise enzimática (LYND,2002; SANDGREN,2005).

São relatadas quatro formas de sinergismo entre as celulasas: (i) EG e CBH, liberando principalmente oligossacarídeos e celobiose; (ii) CBH I e CBH II, aumentando o número de unidades de celobiose liberadas a partir das extremidades redutoras e não redutoras nas cadeias de celulose; (iii) CBH e BGL quando não é desejável grandes quantidades de celobiose como produto final; e (iv) sinergia intramolecular entre os domínios e módulos de ligação catalíticos (LYND,2002; SANDGREN,2005).

Para a quebra das ligações glicosídicas β 1 \rightarrow 4 da celulose, as enzimas utilizam dois diferentes mecanismos. No primeiro, chamado de retenção, o carbono anomérico (C1) permanece na conformação β (abaixo do plano da molécula) após a quebra da ligação glicosídica. No outro mecanismo, chamado de inversão, a configuração do carbono anomérico é alterada para forma α (acima do plano da molécula) durante a hidrólise (LYND,2002; SANDGREN,2005).

Em estudos comparativos com CB *in natura* vs. CB pré-hidrolisada com HCl 2,5 M, nota-se uma diferença do comportamento enzimático frente a estes diferentes substratos. A CBH I de *Trichoderma viride* rapidamente é capaz de hidrolisar os dois substratos, já a EG do mesmo microrganismo possui ação muito limitada quando usada de modo isolado. O uso combinado das duas enzimas aumenta significativamente a taxa de sacarificação da celulose *in natura*, porém nenhum sinergismo é observado no substrato pré-hidrolisado. Frente a estes resultados, os autores concluem que CB *in natura*, devido a estrutura das microfibrilas da celulose, parece ter uma alta sensibilidade para a ação combinada das duas enzimas. Já os agregados de microfibrilas de CB pré-tratada com ácido não foram desintegrados pela mesma combinação. Estas diferenças estruturais da celulose são muito importantes no que diz respeito à sua susceptibilidade à hidrólise enzimática. Apesar da CB ser mais suscetível ao ataque de celulasas do que outros substratos, as razões para este fenômeno ainda não foram claramente elucidadas (SAMEJIMA,1997).

3.6 MÉTODOS DE MENSURAÇÃO DA ATIVIDADE CELULOLÍTICA

A caracterização das enzimas celulolíticas apresenta estudos cinéticos complexos, já que o substrato natural, a celulose, é insolúvel e estruturalmente variável, portanto, relativamente indefinido no que diz respeito à concentração e forma química. O fato de as enzimas celulolíticas atuarem de maneira sinérgica, tendo no curso da hidrólise uma gama de produtos e de envolver vários mecanismos de controle de retro-alimentação, traz a esse tipo de estudos ainda mais dificuldades. Por isso, existem diversos ensaios, a maioria, específicos para cada tipo de enzima. Os mais utilizados são escolhidos com base no uso comum e facilidades processuais (GHOSE,1987).

Durante a hidrólise da celulose são liberados oligossacarídeos de diversos pesos moleculares e principalmente moléculas de celobiose e glucose, que são açúcares redutores, por possuírem pelo menos um carbono anomérico não envolvido em ligação glicosídica, passível de sofrer oxidação. Por esse motivo, diversos testes para a determinação de açúcares, utilizando métodos colorimétricos são descritos na literatura. São exemplos de testes para carboidratos: α -naftol (carboidratos em geral), benzidina (pentoses e ácido urônico), naftoresorcinol (ácido urônico), resorcinol e resorcinol dissulfônico (cetoses). Estes testes utilizam aminas aromáticas ou fenóis como cromóforos, já que estes compostos, na presença de ácido sulfúrico (desidratante) e carboidratos, geram compostos coloridos. Dentre os testes específicos para açúcares redutores temos o que utiliza ácido 3,4-dinitrobenzóico, o-dinitrobenzeno, ácido pícrico e ácido 3,5-dinitrosalicílico (DUBOIS,1956).

3.6.1 Método do dinitrosalicilato para mensuração de açúcares redutores

O método do dinitrosalicilato tem como princípio o fato dos açúcares reduzirem o reagente DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) na presença de hidróxido de sódio, para o composto 3-amino-5-nitrosalicílico, um produto de cor laranja-

avermelhado, que pode ser facilmente mensurado em 540 nm, como pode ser visto na FIGURA 9. O grupo aldeído dos açúcares redutores é oxidado para carbonila (NELSON,2006).

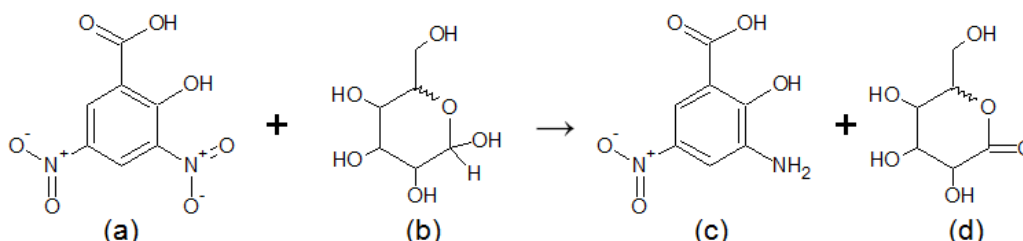


FIGURA 9 - ESQUEMA DE REAÇÃO DE REDUÇÃO DO ÁCIDO 3,5-DINITROSALICÍLICO FORMANDO COMPOSTO COLORIDO

NOTA: (a) ácido 3,5-dinitrosalicílico (cor amarela); (b) açúcar redutor genérico; (c) 3-amino-5-nitrosalicílico (cor laranja-avermelhada) e (d) açúcar oxidado.

Para realizar esse ensaio, primeiro é necessário preparar o reagente a base de ácido 3,5-dinitrosalicílico, tartarato duplo de sódio e potássio e hidróxido de sódio. O teste tem uma faixa de detecção de 0,05 – 0,8 mg de açúcar redutor por amostra. A redução do reagente DNS ocorre a quente (MILLER,1959).

3.6.2 Teste de sacarificação de celulasas utilizando papel de filtro

As incubações são realizadas com aproximadamente 50 mg de amostra de papel de filtro (PF) Whatman n.1 (fita de 1 x 6 cm) em solução de citrato sódico (50 mM pH 4,8), sob agitação constante por 1h a 50 °C. É necessário fazer tantos pontos quanto necessário para descobrir qual a concentração enzimática capaz de liberar 2 mg de glucose. Após as hidrólises, são mensuradas as quantidades de açúcar redutor liberados pelo método DNS, explicado anteriormente. Ao final do experimento, é construído um gráfico com a concentração enzimática e mg de glucose liberada, gerando a equação da reta e o R². Calcula-se então a quantidade de enzima necessária para liberar 2 mg de glucose. Para calcular o valor na unidade FPU (*Filter Paper Unit*), é necessário dividir a constante 0,37 pela concentração de enzima (U/mL) necessária para hidrolisar os 2 mg de açúcar redutor (GHOSE,1987).

Um dos inconvenientes do teste de sacarificação de celulases utilizando PF é conseguir determinar a diluição necessária para que ocorra 3,6% de hidrólise (liberação de 2 mg de glucose). Isso se dá porque a atividade das enzimas celulolíticas não é linear. Tradicionalmente, uma gama de diluições são necessárias para afinar o nível de confiança (DECKER,2003).

3.6.3 Teste da carboximetilcelulose para endo-glucanases

Esse teste é mais específico para determinar a atividade das enzimas EG. Uma solução de carboximetilcelulose (CMC) a 2% em tampão citrato sódico (50 mM, pH 4,8) é hidrolisada por 30 minutos a 50 °C com diferentes concentrações enzimáticas. Após a hidrólise, são mensuradas as quantidades de açúcar redutor pelo método DNS. Constroem-se um gráfico e com a equação da reta gerada, calcula-se a quantidade de enzima necessária para liberar 0,5 mg de glucose. O valor na unidade CMC, é calculado dividindo a constante 0,185 pela concentração de enzima (U/mL) necessária para hidrolisar 0,5 mg de açúcar redutor. (GHOSE,1987)

Da mesma forma com que ocorre com o teste de sacarificação de celulases utilizando PF, o teste utilizando CMC também não é linear, e possui a dificuldade de encontrar a concentração enzimática exata que libere os 0,5 mg de glucose após os 30 minutos.

3.6.4 Métodos utilizando substrato tingido

A utilização de uma variedade de substratos tingidos covalentemente com o corante Azul Brilhante de Remazol R (RBB R ou Azure-RBB) e outros corantes para mensuração de atividade enzimática são descritos na literatura. Existem trabalhos sobre quitina Azure-RBB, para avaliação de atividade de quitinases, xilana Azure-RBB para a determinação da atividade de xilanases e outros exemplos (BIELEY,1988; LAI,2006).

Para o teste de sacarificação com celulases, são utilizados os mais diferentes substratos celulósicos tingidos. Algodão Azure-RBB demonstra reduzir significativamente a atividade das enzimas, principalmente das CBH, mais intensamente da CBH I, que age a partir da extremidade redutora, afetando o sinergismo das celulases (MINORU,2005). Em outros trabalhos, com celodextrinas tingidas, na forma solúveis (FERNLEY,1963) ou insolúveis (LAI,2006), há boa correlação entre açúcares e corante liberados. Papel de filtro Whatman n.1 também já foi utilizado como substrato cromogênico para mensuração de atividade enzimática (LEISOLA,1976), bem como celulose micro-cristalina, Avicel®, a qual possui patente desde 1983 (PALMISANO,1993; ZEIKUS,1983).

3.7 CORANTES

Corantes são extensamente usados para tingimento de produtos têxteis, plásticos, alimentos, entre outras aplicações industriais. A produção mundial está estimada em cerca de 800 mil toneladas/ano, existindo mais de 27 mil tipos comercialmente disponíveis (ADA,2009; KOLONKO,2005).

Corantes sintéticos são classificados pelos seus cromóforos, que têm diferentes estruturas químicas e estabilidade suficiente para suprir as diferentes exigências de coloração. São eles derivados diclorotriazinicos, halogenados heterocíclicos, vinilsulfitos, bromo acrilamidas, entre outros. A variação de substituintes faz o grande número de variação de coloração e tonalidade e difere as condições de fixação dos corantes (ADA,2009; KOLONKO,2005)

3.7.1 Azul Brilhante de Remazol R

O corante Azul Brilhante de Remazol R, RBB R ou Azure, é um dos mais importantes corantes da indústria têxtil pois é capaz de se ligar covalentemente a fibras de celulose, por esse motivo faz parte do grupo de corantes reativos.

Frequentemente utilizado como material de início na produção de corantes poliméricos, é disulfito, derivado antracênico (FIGURA 10) que representa uma importante classe tóxica e recalcitrante de organopoluentes (ADA,2009).

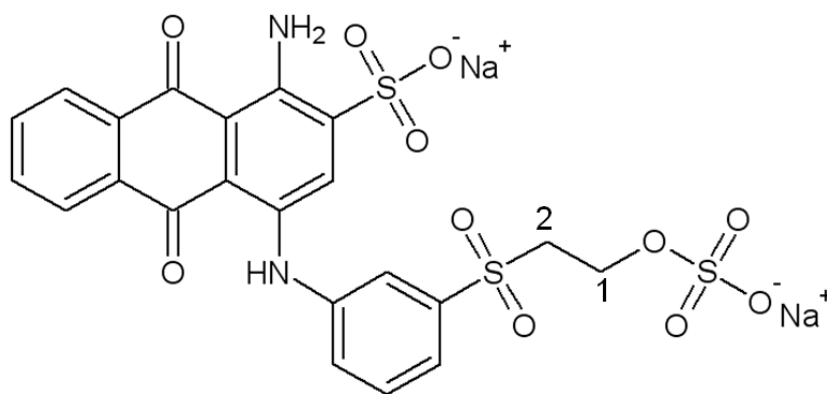


FIGURA 10 - ESTRUTURA DO CORANTE AZUL BRILHANTE DE REMAZOL R
NOTA: Destaque para os carbonos 1 e 2 subsequentes ao grupo sulfito mais exposto.

O RBB reage com a celulose, usualmente algodão, por meio de uma adição nucleofílica, em meio levemente alcalinizado com hidróxido de sódio ou carbonato de cálcio, de forma que o átomo de oxigênio do C6 da celulose possa substituir os átomos de sódio do corante, formando ligação covalente e garantindo a fixação do corante ao tecido, como vemos na FIGURA 11. Após lavagem com água, o segundo átomo de sódio é substituído por uma molécula de água, formando uma hidroxila. A concentração do corante RBB R não adsorvido pode ser colorimetricamente medida utilizando um espectrofotômetro, com a absorbância em 595 nm. A ligação com a celulose ocorre de maneira superficial e preferencialmente na hidroxila do C6 devido ao excessivo número de ligações de hidrogênio em que as demais hidroxilas estão envolvidas (ADA,2009; BRISTOL; HARRIS,2001).

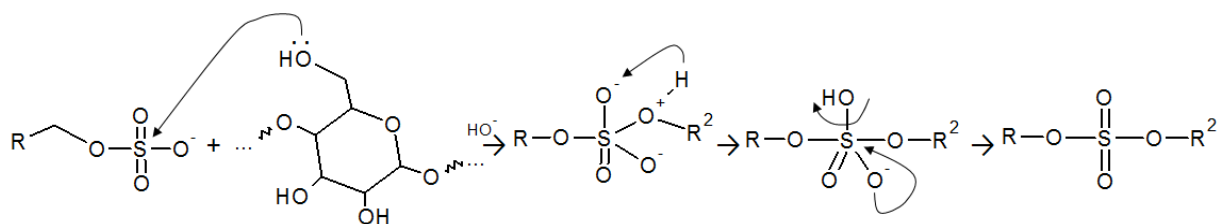


FIGURA 11 - REAÇÃO DE FIXAÇÃO DO CORANTE RBB NAS FIBRAS DA CELULOSE
FONTE: adp. (HARRIS,2001)

O corante RBB R é frequentemente utilizado para ensaios colorimétricos devido a sua alta absorvidade molar (coeficiente de extinção molar) – ϵ de 5820 M/cm. Esta propriedade, relacionada com a capacidade que um Mol de uma determinada substância possui de absorver luz a um dado comprimento de onda, segue fórmula da lei de Beer-Lambert, conforme FIGURA 12, onde (A) é a absorbância, (ϵ) é o coeficiente de absorvidade molar (M/cm), (l) é a distância que a luz atravessa pelo cubeta (cm), (c) é a concentração da substância absorvente no meio (M/L) (CUSTODIO,2000).

$$A = \epsilon \times l \times c$$

FIGURA 12 - FÓRMULA DA LEI DE BEER-LAMBERT PARA DETERMINAÇÃO DO COEFICIENTE DE ABSORÇÃO DE UMA SUBSTÂNCIA

A busca por diferentes corantes com alto coeficiente de absorbância, ou o incremento deste coeficiente para o corante Azul Brilhante de Remazol R, através de alteração química, são alternativas pertinentes para a obtenção de substratos celulolíticos com maior potencial de mensuração através de mensuração direta de hidrolisado por espectrofotometria UV-Vis.

4 METODOLOGIA

4.1 MÉTODOS ANALÍTICOS

4.1.1 Análise de açúcares totais

A determinação de açúcares totais foi realizada conforme a técnica de fenol sulfúrico, descrita por (DUBOIS,1956). O fenol na presença de ácido sulfúrico pode ser usado como método colorimétrico quantitativo de micro-determinação de açúcares e seus metil derivados, oligossacarídeos e polissacarídeos. A reação é baseada na desidratação do carboidrato na presença do ácido sulfúrico, produzindo um aldeído (pentoses são desidratadas até furfural e hexoses até 5-hidroximetilfurfural), que é capaz de se condensar com duas moléculas de fenol resultando em um composto de cor amarelo-alaranjado, conforme ilustrado na FIGURA 13:

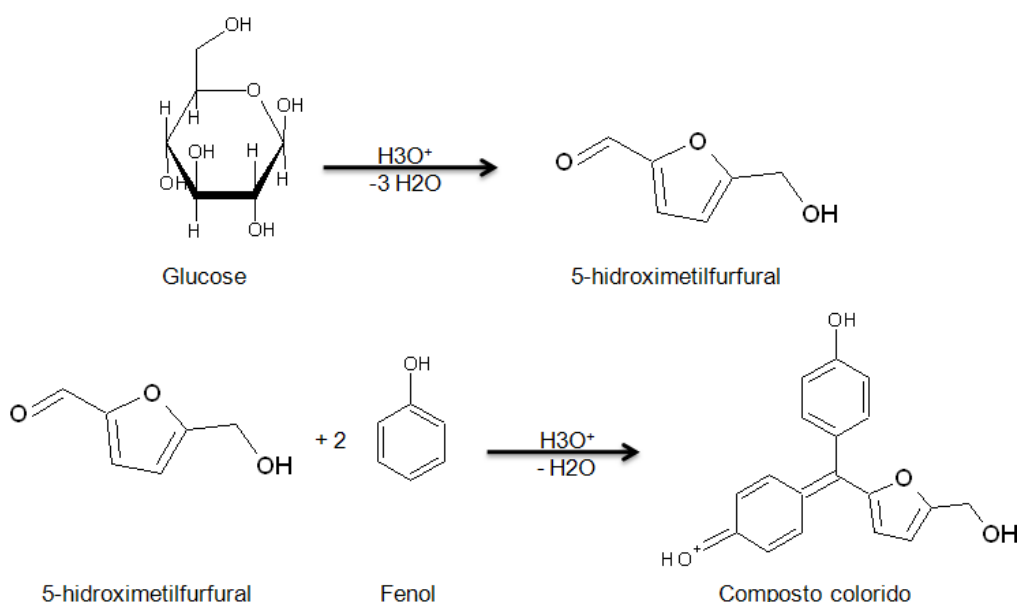


FIGURA 13 - ESQUEMA DE REAÇÃO DE DETERMINAÇÃO DE AÇÚCARES TOTAIS PELO MÉTODO FENOL SULFÚRICO

Para a realização do ensaio foi necessário que os tubos de vidro fossem lavados exaustivamente, para a remoção de quaisquer resíduos, evitando assim possíveis interferentes no teste. As amostras (triplicata) contendo 0,1-60 µg de açúcar foram adicionadas em água q.s.p 0,5 mL. Adicionou-se a mistura, 0,5 mL de solução fenol 5% (0,53 Mol/L). Em seguida, adicionou-se de forma rápida e direta, 2,5 mL de ácido sulfúrico concentrado, seguido de homogeneização e repouso por 15 minutos. Decorrido este tempo, os tubos foram levados ao banho-maria a 30°C por 15 minutos e em seguida foram realizadas as leituras em espectrofotômetro (Shimadzu UV-1650 PC) em 480 nm. Para a calibração do equipamento foi utilizada uma amostra utilizando água e os demais reagentes, processada da mesma maneira.

O cálculo das quantidades de açúcar total (µg/ensaio) foi realizado a partir da equação da reta de uma curva de calibração de uma solução diluída 1:10 de glucose e frutose (1:1) a 100 mg%, obtida com o *software* Excel.

4.1.2 Análise de açúcares redutores

A determinação dos açúcares redutores foi realizada pelo método do ácido dinitrosalicílico (DNS) descrito por (MILLER,1959), conforme descrito no item 3.6.1. Para a realização do ensaio foi necessário preparar o reagente de DNS, conforme consta na TABELA 1. As frações A e B foram levadas ao aquecimento separadamente até completa solubilização dos sais. Após a solubilização, as duas frações foram homogeneizadas e o volume acertado com água destilada para 500 mL de solução final.

TABELA 1 - COMPOSIÇÃO REAGENTE DINITROSALICÍLICO (DNS)

A	Ác. 3,5-Dinitrosalicílico	5 g
	Solução NaOH 2M	100 mL
B	Tartarato duplo de Sódio e Potássio	150 mL
	H ₂ O destilada	300 mL

NOTA: O volume final deve ser completado para 500 mL

As amostras foram preparadas em duplicatas contendo de 0,05-0,8 mg de açúcar redutor foram adicionadas em água destilada q.s.p 750 µL. A seguir, foram

adicionados 500 μ L do reagente DNS e levados a fervura em banho-maria durante 5 minutos. Decorrido este tempo, foram adicionados 3,750 mL de água destilada e após o resfriamento, foram realizadas as leituras em espectrofotômetro (Shimadzu UV-1650 PC) em 540 nm. O equipamento foi calibrado com uma amostra contendo apenas água e reagente DNS, processada da mesma forma que as demais amostras.

Os cálculos das quantidades de açúcar redutor (mg/amostra) foi realizado a partir da equação da reta, de uma curva de calibração, em triplicata, contendo dez pontos utilizando de maneira interpolada três soluções padrão de glucose 100 mg%, utilizando o *software* Excel.

4.1.3 Análise de células totais por turbidimetria

A análise das células totais foi realizada através de técnica de turbidimetria, segundo (CARVALHO,1994). As amostras (1 mL) foram centrifugadas em 13.000 rpm, durante 10 minutos (Eppendorf - Mini Spin Plus). Os precipitados foram ressuspensos em uma solução de salina 0,9% estéril q.s.p. 1 mL. As amostras convenientemente diluídas ($5-250 \times 10^6$ células totais/mL) foram analisadas em espectrofotômetro (Shimadzu UV-1650 PC) em 660 nm.

Para a determinação da quantidade de células totais na amostra, em duplicata, foi utilizada a equação da reta de uma curva de calibração obtida por contagens diretas em câmara de Neubauer, de diferentes diluições. A contagem foi realizada nos 25 quadrados centrais da câmara, cada qual sub-dividido em 16, num total de 400 quadrados do retículo central, o que representa um volume de $0,1 \text{ mm}^3$. Para cálculo do número de células totais por mL foi realizado por regra de três simples, considerando que 1 mL possui 1000 mm^3 . A curva de calibração foi obtida com auxílio do *software* Excel, relacionando as absorbâncias vs. valores de células totais ($\text{n. células} \times 10^6/\text{mL}$).

4.1.4 Análise colorimétrica de liberação do corante RBB

A análise colorimétrica de liberação do corante RBB R se deu pela mensuração direta em espectrofotômetro (Shimadzu UV-1650 PC) no comprimento de onda máximo de 593 nm determinado por varredura de solução (5 µg/mL) de corante da amostra após centrifugação em 13.000 rpm, durante 10 minutos (Eppendorf - Mini Spin Plus).

O cálculo da quantidade de corante presente em cada amostra (mg de RBB/ensaio) foi realizado através da equação da reta da curva de calibração obtida, em triplicata, contendo doze pontos, a partir de uma solução padrão de RBB R 1g%, utilizando o *software* Excel.

4.1.5 Análise por espectroscopia no infravermelho

A técnica de espectroscopia por reflexão atenuada no infravermelho médio foi realizada no Departamento de Química da Universidade Federal do Paraná, em espectrômetro Bruker Vertex 70 com detector DTGS (*Deuterated triglycine sulfate*), faixa de 4000 - 400 cm⁻¹, resolução de 4 cm⁻¹ e 16 scans com amostra no estado sólido.

4.1.6 Análise por ressonância magnética nuclear

Foram realizadas análises de RMN em espectrômetro (Bruker Avance III 500 de 11,75 T), com frequência de 125,76 Hz para núcleos ¹³C e 500,13 Hz para núcleos ¹H, no Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás.

As técnicas utilizadas para amostras em estado sólido foram: polarização cruzada em rotação do ângulo mágico (CP-MAS) para núcleos ¹³C; e alta resolução em rotação do ângulo mágico (HR-MAS) para núcleos ¹H. As amostras em estado

sólido foram previamente cominuídas em moinho criogênico (CentiPrep Freezer Mill, modelo 6750), no Laboratório de Análise de Química Analítica da EMPRAPA, São Carlos/SP. Ao material pulverizado foram adicionadas duas gotas de solução de trimetilsililpropionato de sódio (TMSP-*d*4) em solvente 0,1 g%. O solvente deuterado foi utilizado para ajuste da homogeneidade do campo magnético.

Para as amostras solúveis foi utilizado DMSO-*d*6 como solvente. Os padrões foram analisados tanto em ^{13}C e ^1H RMN, sendo que para o padrão de RBB foi utilizada a sonda inversa TBI (*Tuneable Multinuclear Triple*). Também foram realizadas análises com espectrometria bi-dimensional de RMN ^1H - ^{13}C para identificação de amostras. Com técnica de correlação heteronuclear através de múltiplas ligações (HMBC) é possível analisar os hidrogênios que são correlacionados por duas-três ligações do um carbono observado. Enquanto a técnica de coerência quântica heteronuclear única (HSQC) analisa os hidrogênios que estão correlacionados diretamente ao carbono observado.

Os espectros tiveram as distorções de fase e linhas de base corrigidas pelo *software* MestReNova (Versão 6.2.1-7569).

4.1.7 Análises por cromatografia em camada delgada

Foram realizadas análises de açúcares (glucose, celobiose e outros celoligossacarídeos) e RBB por Cromatografia em Camada Delgada (CCD) utilizando cromatoplasmas de sílica gel 60 (Merck), fase móvel acetonitrila: isopropanol: água (15:3:6) ou acetonitrila: isopropanol: água: ácido acético glacial (20:4:3:0,27). Como agente revelador foi utilizado uma solução 0,5 g% de orcinol sulfúrico (5% de H_2SO_4 em metanol) com aquecimento até o aparecimento de manchas violáceas a negras. A análise do perfil dos fruto-oligossacarídeos utilizou como fase móvel isopropanol: acetato de etila: água (15:6:3), e orcinol sulfúrico como revelador. A obtenção de cromatogramas destas placas foi realizada com densitometria em 570 nm (Shimadzu CS-9301 PC) equipado com uma lâmpada de tungstênio.

4.1.8 Análises estatísticas

4.1.8.1 *Planejamento fatorial*

O planejamento fatorial permite avaliar os efeitos de mais de uma variável ao mesmo tempo, utilizando um menor número de ensaios (BARROS-NETO,2007).

A análise dos resultados obtidos para o planejamento fatorial inicia-se pelo cálculo da estimativa de erro (erro padrão da estimativa), multiplicada pelo valor de t tabelado para significância de 95% utilizando o número de experimentos como valor de grau de liberdade. Este valor obtido serve para validar o efeito de primeira e segunda ordem, que para serem significativos devem ser maiores que a estimativa de erro.

Os resultados são analisados com o objetivo de obter um modelo linear ou quadrático para os planejamentos. Todas as análises de variância devem ser validadas para uma significância de 95%. Nos casos em que os planejamento não puderam ser ajustados no modelo linear, foi realizado um planejamento em estrela, acrescentando um planejamento idêntico, porém rotacionando em 45° em relação à origem. O resultado é uma distribuição octogonal com os níveis $\pm \sqrt{2}$.

4.1.8.2 *Teste t pareado*

O teste t pareado foi utilizado para comparar duas amostras e verificar se existe diferença estatística entre elas. Se os valores encontrados neste teste foram inferiores ao valor de α (nível de significância), apresentam diferença significativa entre as duas amostras (LEVINE,2008).

4.1.8.3 Teste de correlação de Pearson

Para comparação estatística também foi utilizado o coeficiente de correlação de Pearson que mede a força relativa de uma relação linear entre duas variáveis numéricas (COHEN,2003). Os valores para o coeficiente de correlação, representados por r ou pela letra grega ρ , podem ser classificados de acordo com o grau de intensidade, chegando a valores próximos a um quanto maior a correlação. Os resultados obtidos foram avaliados através de teste t .

4.2 OBTENÇÃO DE MEMBRANAS DE CELULOSE BACTERIANA

4.2.1 Isolamento de colônias de *Gluconacetobacter xylinus* produtoras de celulose

As colônias de *G. xylinus* foram isoladas de fermentado acético de vinho tinto. Alíquotas deste foram adicionadas em quantidades crescentes de 1-10% no meio caldo Alabama modificado, conforme TABELA 2, contendo 5% de etanol absoluto e 100.000 UI de nistatina/L, e cultivados em temperatura ambiente (25°C).

TABELA 2 - COMPOSIÇÃO CALDO ALABAMA MODIFICADO/ LITRO

A	Sacarose	50 g
	Fosfato de potássio monoácido	5 g
B	Extrato de levedura	2,5 g
	Sulfato de amônio	0,6 g
	Sulfato de magnésio heptahidratado	0,2 g

Para o preparo do meio de cultivo a sacarose (A) foi solubilizada em 500 mL de água destilada, e o restante dos componentes (B) foram solubilizados nos 500 mL restantes. Os dois erlenmeyers foram autoclavados (1 atm) durante 15 minutos. Antes da utilização, as duas frações foram misturadas em um erlenmeyer único, onde posteriormente (quando o meio se encontrava em temperatura ambiente) foi adicionado 5% de etanol absoluto e 100.000 UI de nistatina/L. O pH do meio foi ajustado para 5 com hidróxido de amônio ou ácido acético (1 M).

O cultivo foi realizado em copos de vidro (7,5 cm de diâmetro X 7,5 cm de altura) cobertos com papel toalha, sem agitação, contendo 130 mL do meio caldo Alabama modificado, durante aproximadamente 15 dias em temperatura ambiente, até obtenção de membranas frescas de celulose, com cerca de 3-5 mm de espessura. Para evitar o ressecamento das membranas o papel toalha foi umidificado diariamente.

4.2.2 Cultivo e manutenção da colônia de *Gluconacetobacter xylinus*

Para a manutenção da cepa e produção de membranas frescas de celulose, foram realizados repiques sucessivos das colônias isoladas de *G. xylinus*, em meio caldo Alabama modificado, conforme descrito no item 4.2.1.

Os repiques se deram pela transferência de fragmentos de membranas de celulose em copos de vidro contendo 100 mL de meio caldo Alabama e 30 mL do meio caldo Alabama acidificado pelo cultivo anterior. Os copos ficaram em temperatura ambiente, cobertos por papel toalha, durante 7-8 dias até a formação de novas membranas de cerca de 3-5 mm de espessura úmida.

4.2.3 Cinética de crescimento de *Gluconacetobacter xylinus*

Para o monitoramento do crescimento de colônias de *G. xylinus* por 192 horas (8 dias - tempo estimado para produção de membranas de CB de 3-5 mm), foi realizado o cultivo em 24 copos de vidro à temperatura ambiente (25°C), contendo:

- 100 mL de meio caldo Alabama modificado;
- 30 mL de meio caldo Alabama de cultivos anteriores centrifugado por 30 minutos a 8.000 rpm, para remoção de resíduos celulares;
- 0,5 mL de *pool* de células, resultando em $4,13 \times 10^6$ células totais/mL de meio. O *pool* foi obtido pela centrifugação de meio Caldo Alabama de cultivos

anteriores, onde as células precipitadas foram ressuspensas com solução salina 0,9% estéril.

O experimento foi realizado com em triplicata, conforme esquematizado na FIGURA 14. A triplicata do copo 1 foi analisada nos tempos 0h e 24h, os demais copos foram analisados segundo esquema, apenas no seu tempo correspondente, a cada 24h, totalizando 192 h (8 dias), a fim de evitar contaminação e/ou atraso no início da produção de celulose.

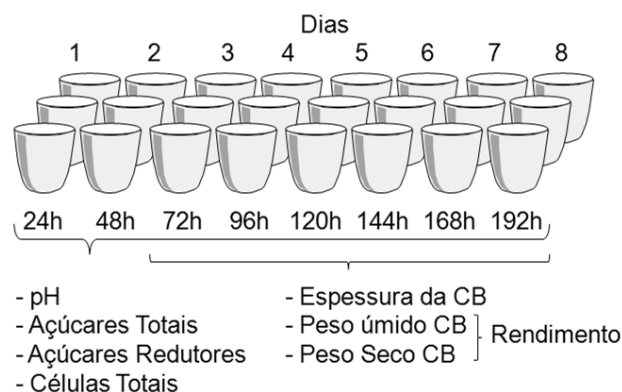


FIGURA 14 - EXPERIMENTO DE CINÉTICA DE CRESCIMENTO DE *Gluconacetobacter xylinus*

As análises foram realizadas segundo as especificações abaixo:

- pH do meio: leitura realizada em potenciômetro (Gehaka PG 1800) após a remoção de membrana formada;
- n° de células totais: análise por turbidimetria conforme explicado no item 4.1.3. Nos copos em que já havia membrana, esta foi esmagada, para liberação das células aderidas na membrana flotante, e o meio foi homogeneizado antes da retirada da alíquota para centrifugação;
- açúcares totais: análise por técnica fenol-sulfúrico, realizada segundo metodologia descrita no item 4.1.1.
- açúcares redutores: análise por técnica do ácido 3,5-dinitrosalicilato (DNS) realizada conforme item 4.12.
- espessura das membranas: a mensuração das membranas úmidas foi realizada diretamente nos copos utilizando paquímetro (Mitutoyo®);

- peso úmido e seco: foi realizada em balança analítica (Bel U-MARK 250A-Classe I) a determinação dos pesos e calculado o rendimento da produção de membranas de CB.

4.2.4 Cultivo de *Gluconacetobacter xylinus* utilizando fruto-oligossacarídeos como fonte alternativa de carbono

Como fonte de carbono alternativa para a produção de *G. xylinus* foram utilizados fruto-oligossacarídeos (FOS). Para a produção destes, é utilizada como matéria-prima a inulina que é um polímero formado majoritariamente de frutose ligado a uma sacarose, em que as ligações das unidades de frutose na forma furanosídica se dão essencialmente de forma linear, por meio de ligações lábeis do tipo β -1,2 (ROBERFROID,2005).

A hidrólise com catalisadores brandos, como ácido fosfórico e ácido cítrico, em condições adequadas, libera FOS de menor grau de polimerização e frutose livre (FONTANA,2007) podendo representar uma fonte de carbono alternativa para o crescimento de *G. xylinus*.

Os hidrolisados de inulina cítricos ou fosfóricos foram obtidos através da despolimerização parcial de 50 mL de uma solução de inulina de *Dahlia* sp. (10g%) utilizando como catalisadores os ácidos cítrico ou fosfórico em pH 2,5, com temperatura de 95°C e tempo de residência de 5 ou 25 minutos, conforme metodologia anteriormente elaborada no LQBB (FONTANA,2007; GRZYBOWSKI,2008) A seguir, os hidrolisados foram filtrados a quente em papel de filtro duplo contendo 200 mg de carvão ativo para redução da quantidade de hidroximetilfurfural (HMF), que pode inibir o crescimento microbiano (FONTANA,2008; LIU,2004; TAHER,1974). Os hidrolisados, com e sem tratamento com carvão ativo, foram adequadamente diluídos e analisados em espectrofotômetro (Shimadzu UV-1650 PC) em 283 nm, para mensuração do HMF.

Comparativamente aos hidrolisados cítricos ou fosfóricos de inulina, foram realizados os cultivos com meios contendo frutose, glucose ou sacarose como fontes de carbono (5 g%) em meio caldo Alabama modificado.

Para cada fonte de carbono diferente, foram realizadas três replicatas separadamente em tubos de vidro (3 cm de diâmetro X 10 cm de altura) contendo 20 mL de meio caldo Alabama modificado.

A inoculação se deu com 0,33 mL de um *pool* de células ATCC 23769, resultando em $5,66 \times 10^6$ células totais/mL de meio, previamente centrifugadas e ressuspensas em uma solução salina 0,9 % estéril.

Foram realizadas análise de açúcares redutores, utilizando uma curva padrão de frutose ou glucose, e número de células totais por turbidimetria, nos tempos 0 e final (7 dias). Após a formação de membranas, foi determinado o rendimento em mg de membranas secas.

4.3 PROCESSAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DA CELULOSE BACTERIANA

4.3.1 Limpeza da celulose bacteriana

As membranas frescas de celulose obtidas dos cultivos foram lavadas superficialmente com água destilada, para remoção do excesso de meio de cultivo e células aderidas. Posteriormente foram realizadas três lavagens sucessivas por imersão de 24-48 h com uma solução aniônica, segundo técnica desenvolvida no LQBB-UFPR, para completa remoção de proteínas e resíduos celulares (FONTANA,1997).

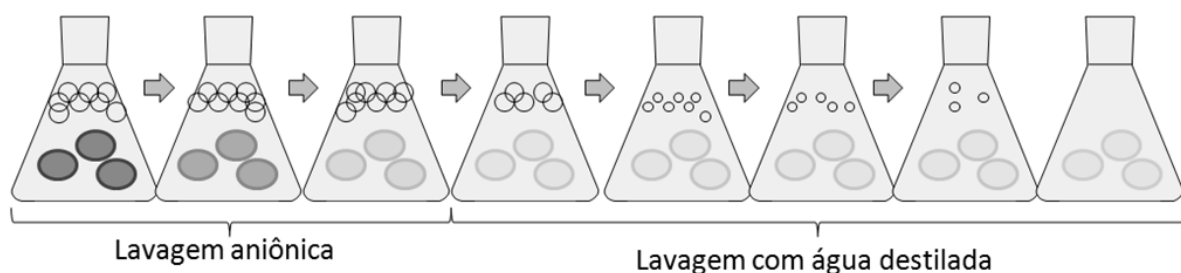


FIGURA 15 - ESQUEMA DE LIMPEZA DAS MEMBRANAS DE CELULOSE BACTERIANA

Por fim, as membranas foram lavadas por até cinco vezes por imersão de 24-48 h com água destilada, para completa remoção da solução aniônica, conforme esquema ilustrado na FIGURA 15. Alíquotas das águas de lavagem foram analisadas em espectrofotômetro (Shimadzu UV-1650 PC) nas absorbâncias de 260 e 280 nm, para mensuração de ácidos nucleicos e proteínas, respectivamente.

4.3.2 Secagem da celulose bacteriana

As membranas de CB, após processo de limpeza, foram secas em equipamento Gel Dryer BIO-RAD (modelo 543), a 90 °C, sob vácuo por 50 minutos. Ao final do processo foram obtidas folhas de CB, semelhantes a papel vegetal, uniforme e semi-transparentes.

4.3.3 Caracterização da celulose bacteriana

A pureza das membranas de CB obtidas foi analisada por refletância utilizando a técnica de reflexão total atenuada no infravermelho médio (ATR-FTIR), conforme descrito no item 4.1.5. Esta técnica não é destrutiva, e permite espectros de amostras pouco solúveis, em filmes no estado sólido, como o caso das membranas processadas (GRANDE,2009).

Utilizando acessório específico, as membranas foram prensadas junto ao cristal de seleneto de zinco (ZnSe), transparente ao infravermelho. O feixe de radiação infra-vermelho penetra apenas em pequena profundidade na amostra, daí o nome reflexão atenuada (UFRGS,2010; ZENI,2005).

4.4 OBTENÇÃO DOS MATERIAIS CELULÓSICOS ALTERNATIVOS

Foram utilizados como fontes alternativas à CB os seguintes materiais compostos por celulose:

- algodão hidrófilo (Cremer®): obtido no comércio de Curitiba – PR, composto exclusivamente por celulose vegetal;

- papel de filtro Whatman n.1: obtido no comércio de produtos químicos e para laboratório, composto exclusivamente por celulose vegetal após processo químico para remoção de outros ligantes e branqueamento do papel;
- celulose micro-cristalina (Avicel® - Merck): obtido no comércio de produtos químicos e para laboratório, composto exclusivamente por celulose vegetal após processo para remoção de outros compostos e posterior hidrólise ácida;
- bagaço de cana-de-açúcar: obtida por doação pela COROL (Cooperativa Agroindustrial – Rolândia/PR) após processo de moagem e lavagem exaustiva para remoção do caldo residual e principalmente glucose livre. O material foi seco, macerado e classificado por processo de tamisação (ABNT/ASTM 12). É composto por celulose vegetal ligada a hemicelulose, lignina e outras substâncias, ou seja, uma holocelulose lignificada.

4.5 TINGIMENTO DOS SUBSTRATOS CELULÓSICOS

O tingimento covalente dos substratos celulósicos se deu por contato de 5 g% (p/v) de amostra com a solução de Azul Brilhante de Remazol R (Sigma-Aldrich) 1 g% (p/v), sob agitação magnética, por 24 h na presença de hidróxido de sódio (50 mM) como agente catalisador. Posteriormente, os substratos celulósicos foram exaustiva e repetidamente lavados com água destilada por centrifugação (Himac CR 20B2), 8000 rpm por 25 minutos, até completa remoção do corante não ligado. Antes do processo de secagem do material, foi realizada uma lavagem com etanol 50%, para completa remoção do corante residual não-ligado.

4.6 INCUBAÇÃO COM ENZIMAS CELULOLÍTICAS

As enzimas utilizadas para as incubações foram celulasas (EG e CHB) de *Trichoderma reesei* (NS 50013; 41,9 mg proteína/mL) e BGL concentradas de *Aspergillus niger* (NS 50010; 86,5 mg proteína/mL), fornecidas pela empresa Novozymes Latin America Ltda, de Araucária/PR.

4.6.1 Hidrólise comparativa entre diferentes substratos celulósicos

Foram realizadas incubações a fim de determinar as melhores condições de hidrólise total para os substratos CB, PF, algodão hidrófilo, bagaço de cana-de-açúcar e celulose micro-cristalina (Avicel®). Estas incubações foram determinantes para a escolha do melhor substrato celulósico para experimentos de mensuração de atividade celulolítica.

A otimização do processo de hidrólise enzimática se deu em duplicata, seguindo um planejamento fatorial 2^2 com ponto central, segundo TABELA 3. As variáveis analisadas foram: temperatura, nos níveis (-1) 30°C, (0) 40°C e (+1) 50°C e proporção entre as enzimas celulase e β -glucosidase, nos níveis (-1) 1:2, (0) 1:1 e (+1) 2:1.

TABELA 3 - PLANEJAMENTO FATORIAL DE OTIMIZAÇÃO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

Variáveis	Níveis		
	(-)	0	(+)
Temperatura de hidrólise (°C)	30	40	50
Proporção de Celulase: β -glucosidase	1:2	1:1	2:1

As hidrólises foram realizadas com 50 mg de amostra (*in natura* ou Azure-RBB) em solução de citrato sódico (50 mM pH 4,8) q.s.p 2 mL, em agitador-incubador na velocidade 4 – 160 rpm (Gyrotory Water Bath Shaker – G76) por 72 h (conforme tempo recomendado pelo fornecedor das enzimas) utilizando 1 μ L/mL de solução enzimática.

Os resultados foram expressos em porcentagens de sacarificação (determinação dos açúcares redutores pelo método de DNS descrito no item 4.1.2) nos incubados. Foram calculadas as estimativas de erro e efeitos de primeira e segunda ordem para cada um dos planejamentos, conforme descrito no item 4.1.8.1.

Foram determinados os coeficientes de correlação de Pearson, conforme descrito no item 4.1.8.3 dos resultados expressos em μMol de glucose e RBB. Por ensaio.

4.6.2 Determinação do potencial de sacarificação dos substratos papel de filtro Whatman n.1 e celulose bacteriana

A determinação do potencial de sacarificação das enzimas foi realizada seguindo ensaio padrão para sacarificação das celulasas (Ensaio FPU – *Filter Paper Unit*) (Ghose, 1987), utilizando comparativamente os substratos PF Whatman n.1 e a CB, ambos *in natura* e Azure-RBB.

As incubações foram realizadas com 50 mg de amostra de celulose em solução de citrato sódico (50 mM pH 4,8) q.s.p 2 mL, sob agitação constante em agitador-incubador na velocidade 4, durante 1 h e temperatura de 50 °C, utilizando quantidades crescentes de solução enzimática de celulase e β -glucosidade na proporção 1:1.

Ao final do experimento, foram construídos gráficos (7 gráficos com 5 diferentes pontos em cada) relacionando a concentração enzimática vs. mg de glucose liberada (determinada pela quantidade de açúcar redutor utilizando o método DNS descrito no item 4.1.2), gerando a equação da reta e o R^2 . Calculou-se então a quantidade de enzima necessária para liberar 2 mg de glucose. Também foi utilizado o coeficiente de correlação de Pearson (item 4.1.8.3) para os resultados expressos em glucose e corante RBB liberado em μMol /ensaio.

4.6.3 Otimização do processo de hidrólise de celulose bacteriana

Para a otimização do processo de celulólise da CB *in natura* e Azure, com a finalidade de facilitar o controle do desempenho das enzimas celulolíticas, foi realizado seguindo um segundo experimento de planejamento fatorial 2^2 , com ponto central, em triplicata. Por se tratar de uma função não linear, foi realizado um planejamento em estrela.

As variáveis analisadas foram temperatura e velocidade do agitador-incubador, em cinco níveis como podem ser observados na TABELA 4:

TABELA 4 - PLANEJAMENTO FATORIAL DE OTIMIZAÇÃO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA PARA CELULOSE BACTERIANA

Variáveis	Níveis				
	$(-\sqrt{2})$	(-1)	0	$(+1)$	$(+\sqrt{2})$
Temperatura de hidrólise (°C)	36	40	50	60	64
Velocidade de Agitação	2	2,5	4	5,5	6

As incubações foram realizadas com 50 mg de amostra de celulose em solução de citrato sódico (50 mM, pH 4,8) q.s.p 2 mL, em agitador-incubador, durante 1 h, utilizando 2,5 $\mu\text{L/mL}$ de solução enzimática contendo celulasas e β -glucosidades na proporção 1:1. As respostas analisadas foram as quantidades liberadas de açúcar redutor e corante, descritas nos itens 4.1.2 e 4.1.4, e comparadas estatisticamente, em μMol de glucose e RBB por ensaio, utilizando o coeficiente de correlação de Pearson e teste *t*.

4.6.4 Cinética hidrolítica da celulose bacteriana Azure-RBB

A cinética de hidrólise da CB Azure-RBB foi realizada em triplicata por até 180 minutos, utilizando 10 mg de amostra, 4 $\mu\text{L/mL}$ de solução enzimática 1:1 em tampão citrato de sódio (50 mM, pH 4,8) q.s.p 2 mL, em temperatura de 50 °C, em agitador-incubador na velocidade 4. Foram analisadas as quantidades de açúcar redutor pelo método de DNS (item 4.1.2) e a liberação de corante (item 4.1.4) nos tempos: 0, 15, 30, 45, 60, 80, 100, 120, 150 e 180 minutos.

Para comparação estatística entre as respostas, foi utilizado o coeficiente de correlação de Pearson e teste *t*, explicado no item 4.1.8.3, dos valores expressos em μMol de glucose e RBB por ensaio.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CURVAS DE CALIBRAÇÃO PARA ANÁLISE DE AÇÚCARES REDUTORES, CÉLULAS TOTAIS E CORANTE RBB

Para a realização dos cálculos de açúcares redutores pelo método do DNS, foram utilizadas as equações apresentadas na FIGURA 16, obtidas pelo isolamento de X das equações da reta, com R^2 de 0,9965, 0,9972 e 0,9976, obtidas através das curvas de calibração de absorbância em 540 nm vs. mg de açúcar redutor respectivamente para glucose, frutose e glucose/frutose.

$$mg \text{ Açúcar Redutor (glucose)} = \frac{Absorbância \text{ em } 540 \text{ nm} - 0,0064}{1,2162}$$

$$mg \text{ Açúcar Redutor (frutose)} = \frac{Absorbância \text{ em } 540 \text{ nm} + 0,0358}{1,2029}$$

$$mg \text{ Açúcar Redutor (glucose/frutose)} = \frac{Absorbância \text{ em } 540 \text{ nm} + 0,0465}{1,2304}$$

FIGURA 16 - FÓRMULAS PARA CÁLCULOS DE AÇÚCARES REDUTORES MENSURADOS PELO MÉTODO DNS

NOTA: Os ensaios foram realizados em triplicata

Para análise por turbidimetria do número de células totais de *G. xylinus*, foi construído um gráfico contendo o número de células totais, obtidos através de contagem direta em câmara de Neubauer vs. Absorbância em 660 nm, resultado em uma equação da reta com R^2 de 0,9956. A fórmula para cálculo de número de células totais/mL está apresentada na FIGURA 17.

$$n. \text{ células totais} \times 10^6 / mL = \frac{Absorbância \text{ em } 660 \text{ nm} - 0,0217}{0,004}$$

FIGURA 17 - FÓRMULA PARA CÁLCULO DE CÉLULAS TOTAIS DE *Gluconacetobacter xylinus*

A curva padrão de concentração para o corante RBB, gerou equação da reta com R^2 de 0,9997. O cálculo da concentração de corante em $\mu\text{g/mL}$ se deu pela fórmula apresentada na FIGURA 18:

$$\mu g/mL \text{ de RBB} = \frac{\text{Absorbância em } 593 \text{ nm} - 0,0062}{0,0849}$$

FIGURA 18 - FÓRMULA PARA CÁLCULO DE MENSURAÇÃO DE CORANTE RBB

5.2 CULTIVO E ISOLAMENTO DE *Gluconacetobacter xylinus*

O cultivo das cepas de *G. xylinus* obtidas por cultivo de fermentado de caqui em meio caldo Alabama modificado, resultou em formação de membranas frescas de celulose, em todas as concentrações (1-10% de fermentado no meio), em até 10 dias de cultivo estático, como pode ser observado na FIGURA 19.

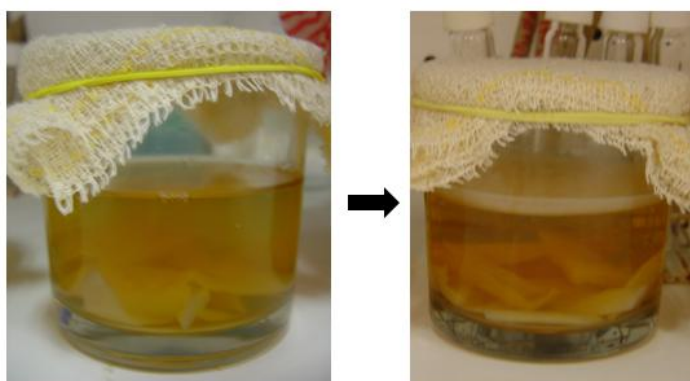


FIGURA 19 - PRODUÇÃO DE MEMBRANAS DE CELULOSE BACTERIANA EM MEIO CALDO ALABAMA MODIFICADO

Estes resultados demonstram que o cultivo em caldo Alabama de fermentado de vinho tinto pode ser uma excelente fonte de *G. xylinus*. Na literatura existem informações de outros isolamentos realizados a partir de vinagres industriais, vinagres deteriorados ou caldo de cana-de-açúcar naturalmente fermentado, uma vez que este microrganismo faz parte da família Acetobacteraceae, que são bactérias produtoras de ácido acético (LPSN,2011; SOKOLLEK,1998).

O meio de cultivo caldo Alabama demonstrou ser efetivo para o isolamento de *G. xylinus*, devido à presença de etanol e nistatina, que promovem o aumento na seletividade, juntamente com o microrganismo, que durante o crescimento, produz ácido acético, o que inibe o crescimento de competidores. Estudos afirmam que

proporções de etanol que variam de 1-5% podem promover também o aumento de produção de celulose em culturas estáticas (CHÁVEZ-PACHECO,2005). Já a presença da nistatina no meio de cultivo auxilia na prevenção contra contaminação fúngica devido sua ação fungistática e fungicida contra uma grande variedade de leveduras e fungos leveduriformes, não interferindo na colônia de *G. xylinus*, pois não apresenta atividade contra bactérias (SANOFI-AVENTIS,2010).

A manutenção da colônia através de repiques sucessivos foi mantida com sucesso por até seis meses. Após este período, as membranas se tornaram rugosas, sendo necessária a realização de novo isolamento a partir de outros cultivos menos frequentemente manipulados. Os repiques foram realizados apenas com as membranas consideradas mais puras e lisas, conforme exemplificado a direita na FIGURA 20. O aspecto rugoso pode ser resultante da co-existência de células “normais” de *G. xylinus*, com células hiper-produtora.

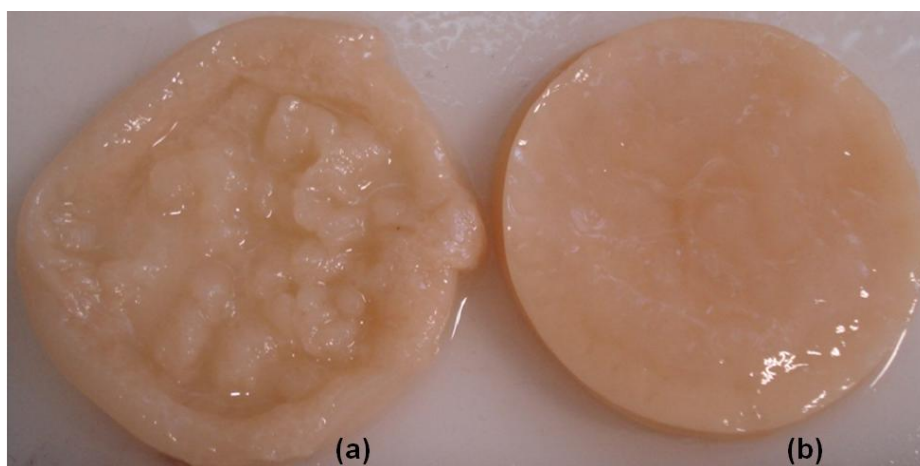


FIGURA 20 - MEMBRANAS DE CELULOSE BACTERIANA
NOTA: (a) membrana rugosa; (b) membrana lisa – “pura”.

5.2.1 CINÉTICA DE CRESCIMENTO DE *Gluconacetobacter xylinus*

Analisando os resultados apresentados no GRÁFICO 4, observa-se que o início de produção significativa das membranas de celulose ocorre após 72 horas de cultivo, coincidindo com o tempo no qual o número de células totais aumenta cerca de 3 vezes, conforme descrito na literatura (ROMLING,2002).

Após os oito dias de cultivo, foram produzidas membranas de celulose com espessura entre 4,5 e 5 mm, pesando, após processo de limpeza e secagem, 25 mg em média por copo contendo 130 mL de meio caldo Alabama. O pH do meio decresceu de 5, no meio caldo Alabama para 3,25 após adição dos 30 mL de meio de cultivo anterior. Este valor reduziu para 2,65 após as 192 horas de cultivo, devido à produção de ácidos orgânicos, provavelmente ácido acético.

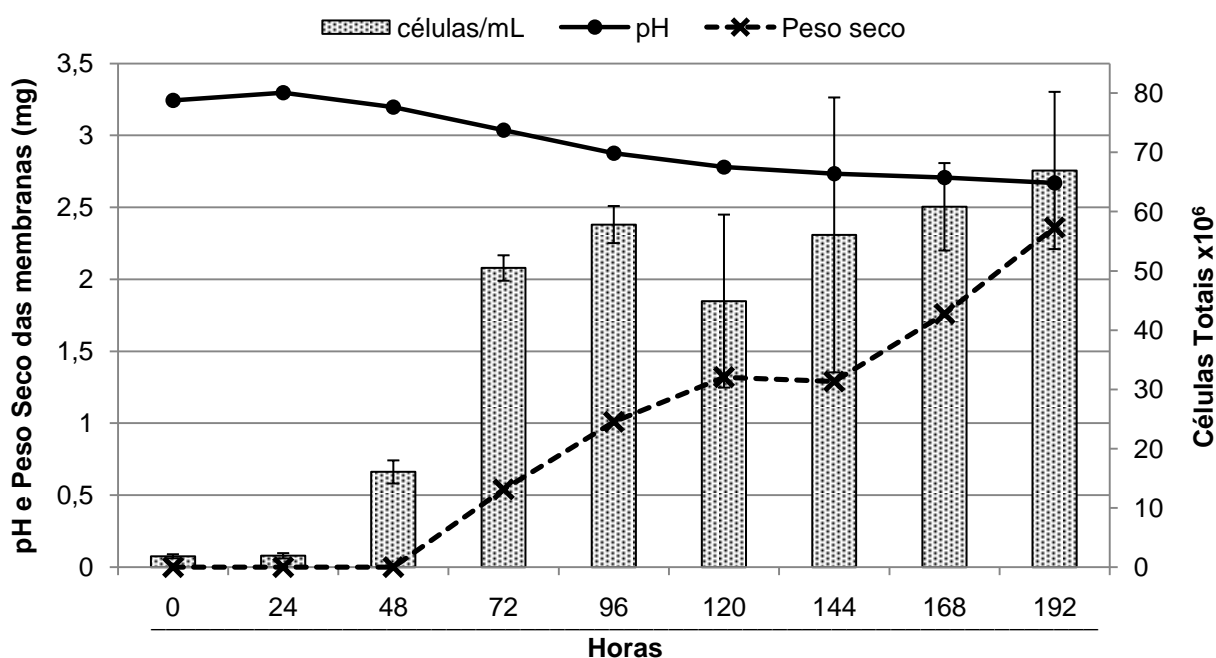


GRÁFICO 4 - ACOMPANHAMENTO DO pH, CÉLULAS TOTAIS E MEMBRANAS DE CELULOSE PRODUZIDAS DURANTE CINÉTICA DE CRESCIMENTO DO *Gluconacetobacter xylinus*

NOTA: Células totais (n = 6), com barras de desvio padrão; pH (n = 3); e peso seco de celulose bacteriana em mg (n = 3).

No GRÁFICO 5 observa-se que o microrganismo é capaz de promover a clivagem da sacarose, em glucose e frutose, pelo aumento na quantidade de açúcar redutor mensurado durante a cinética, indicando que esta cepa possui a capacidade de incorporar sacarose através de atividade extracelular ou de membrana da enzima invertase ou β -frutofuranosidase. Esta propriedade já foi demonstrada anteriormente para as subespécies de *G. xylinus*, *sucrofermentans* BPR 2001 e *nonacetoxidans* LD-2 (BALASUBRAMANIAM,1982; NAKAI,1999). Pode-se perceber que esse aumento não é linear, e a partir de 120 horas há tendência de formação de platô, gerado pela compensação entre liberação e consumos de monossacarídeos.

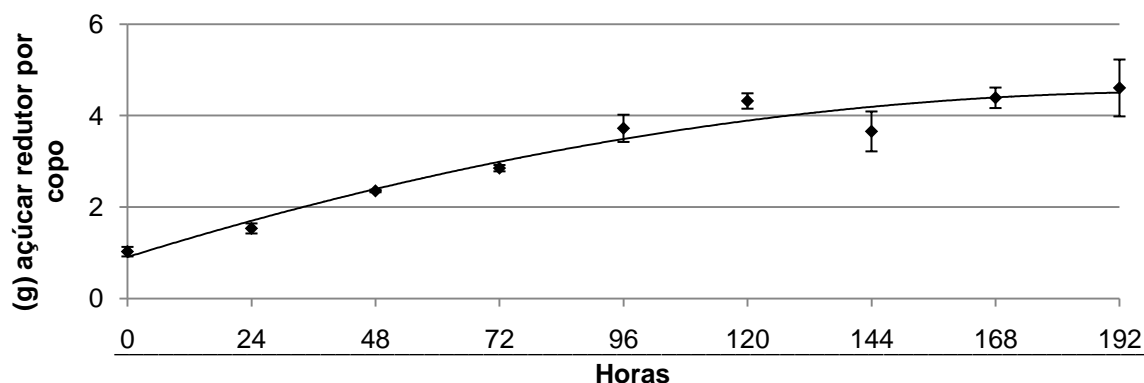


GRÁFICO 5 - ACOMPANHAMENTO DOS AÇÚCARES REDUTORES LIBERADOS DURANTE CINÉTICA DE CRESCIMENTO DO *Gluconacetobacter xylinus*

NOTA: Açúcares redutores calculados através de equação obtida por curva padrão de glucose e frutose em quantidade equimolar ($n = 6$), sendo que as barras representam o desvio padrão.

A quantidade de açúcares totais, determinada pela técnica de fenol sulfúrico através da curva de calibração com R^2 de 0,9975 e equação reta $y = 0,0155x - 0,0021$. Os açúcares totais passaram de 4,64 g% no início do cultivo para 3,89 g% em 192 horas de cultivo, indicando um consumo de 15,95% do açúcar total presente no meio.

5.2.2 Cultivo de *Gluconacetobacter xylinus* utilizando fruto-oligossacarídeos como fonte alternativa de carbono

O tratamento dos hidrolisados ácidos de inulina com carvão ativo mostrou-se efetivo, reduzindo o teor de HMF na ordem de 80% para os hidrolisados cítrico e fosfórico. Esta capacidade de absorção pelo carvão ativo dos produtos de degradação foi observada anteriormente em hidrolisados fosfóricos de amido de mandioca utilizados como fonte de carbono para o crescimento da levedura *Xanthophyllomyces dendrorhous* (PASSOS,2002).

Os perfis dos meios contendo hidrolisados cítrico e fosfórico de inulina (pH 2,5, 95 °C, tempos 5 e 25 min.), assim como os meios contendo sacarose, glucose e frutose foram analisados por cromatografia em camada delgada (CCD) quantitativa, com 2 µL de amostra (diluídas para 2 mg/mL). A placa foi revelado com orcinol sulfúrico à quente, e visualizada em UV-Vis em 375 nm, como mostrado na FIGURA

21. Através do cálculo das áreas dos picos obtidos por densitometria, pode-se perceber um consumo médio de 5% do açúcar presente no meio, sendo que para o hidrolisado fosfórico de inulina esse percentual de consumo aumentou para 10 e 15% para o tempos 5 e 25 minutos respectivamente.

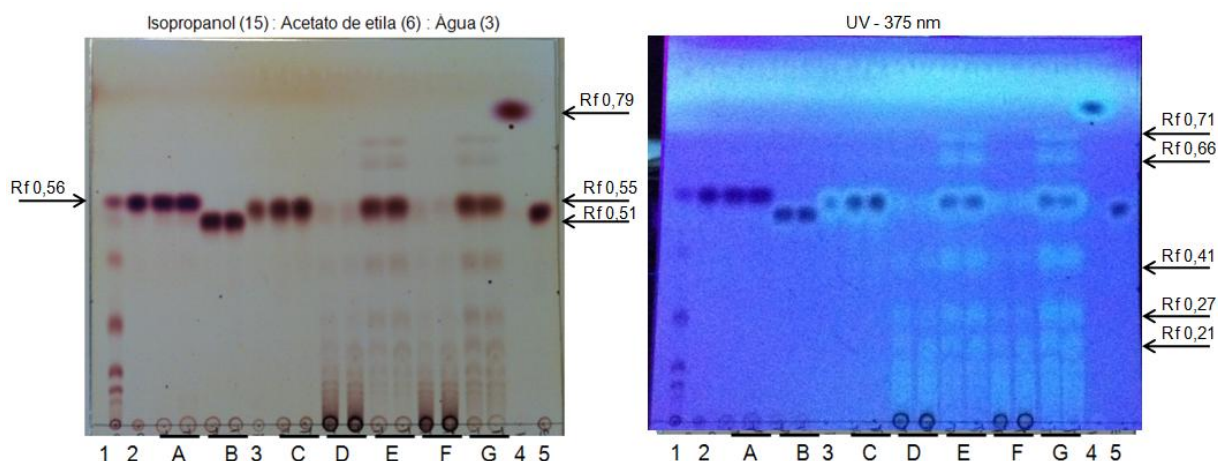


FIGURA 21 - CCD COM PERFIL DOS CARBOIDRATOS ALTERNATIVOS UTILIZADOS PARA O CULTIVO DE *Gluconacetobacter xylinus*

NOTA: 1, 2, 3, 4 e 5 – Padrões de celo-oligossacarídeos, glucose, frutose, HMF e sacarose, respectivamente. (A) Glucose, (B) Sacarose, (C) Frutose, (D) FOS Cítrico 5 minutos, (E) FOS Cítrico 25 minutos, (F) FOS Fosfórico 5 minutos, (G) FOS Fosfórico 25 minutos, sendo ponto da esquerda referente ao tempo zero e o da direita referente ao tempo 7 dias.

Analisando o perfil dos açúcares frutose e fruto-oligossacarídeos, por densitometria, observamos no GRÁFICO 6 que nos hidrolisados cítrico e fosfórico 5 minutos, menor proporção de frutose livre (Rf 0,55) sendo que a porcentagem deste açúcar no tempo 7 dias de cultivo, aumentou discretamente ou se tornou constante, houve consumo dos fruto-oligossacarídeos Rf 0,21, 0,27 e 0,41 indicando que a cepa ATCC 23769 *G. xylinus* possui capacidade de produzir enzimas invertase que a possibilitem assimilar os oligossacarídeos presentes no meio. Observando os hidrolisados de inulina por 25 minutos, vê-se a presença de oligossacarídeos com cadeias maiores, Rf < 0,20, sendo hidrolisados durante cultivo e consumo principalmente da frutose livre (Rf 0,55) presente no meio.

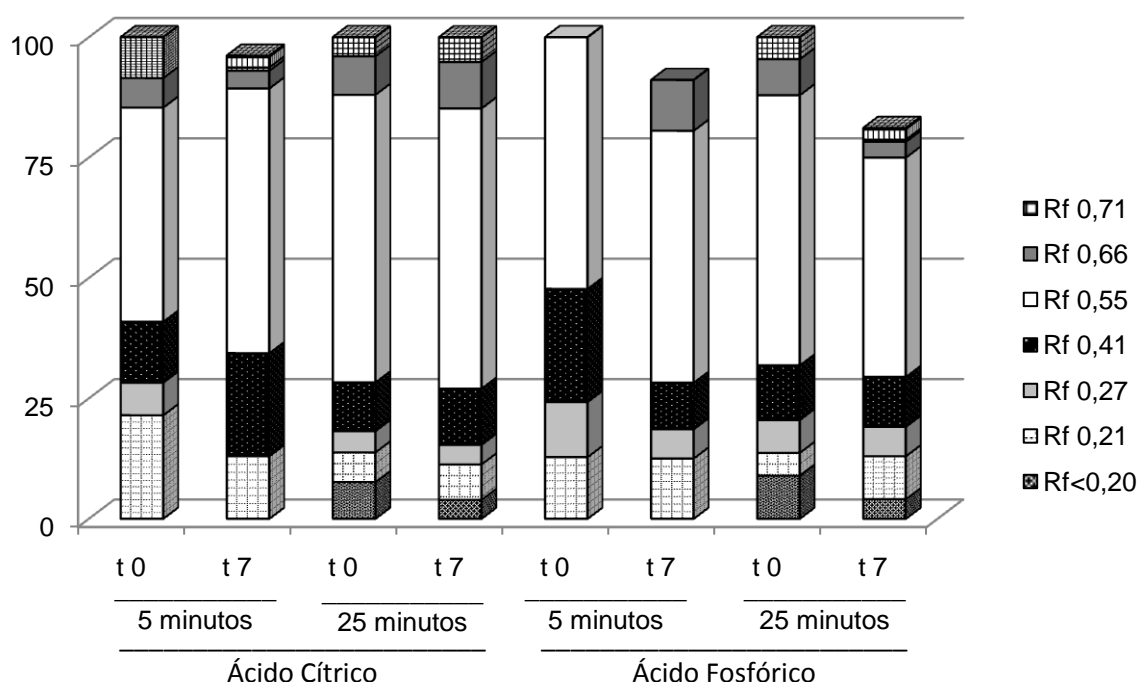


GRÁFICO 6 - PERFIL DOS AÇÚCARES DOS MEIOS DE CULTIVO CALDO ALABAMA MODIFICADO CONTENDO FOS
 NOTA: Média (n = 3) do cálculo de açúcares obtida por densitometria das placas de CCD.

Analisando o cultivo de *G. xylinus* utilizando fontes alternativas de carbono, vemos crescimento significativo ($p < 0,05$) no número de células totais/mL considerando o inoculo inicial de $5,66 \times 10^6$ células totais/mL, com crescimento de membranas de CB.

Conforme observa-se no GRÁFICO 7, os maiores crescimentos bacterianos não coincidiram com as maiores produções de membranas de CB, como sugestionado pela literatura (ROMLING,2002) sendo que as maiores produções foram obtidas com os meios contendo glucose, frutose e FOS cítrico hidrólise de 25 minutos. A produção de CB no meio contendo sacarose como fonte de carbono não ocorreu como esperado, indicando que esta cepa possui capacidade limitada de incorporar sacarose através de atividade extracelular ou de membrana da enzima invertase ou β -frutofuranosidase (BALASUBRAMANIAM,1982; NAKAI,1999). Esta limitação também foi consoante com baixa produção de membranas nos meios FOS cítrico e fosfórico hidrólise de 5 minutos, entretanto com aumento no número de células totais por mL, mostrando que os FOS aumento crescimento celular sem benefício na produção de membranas de CB.

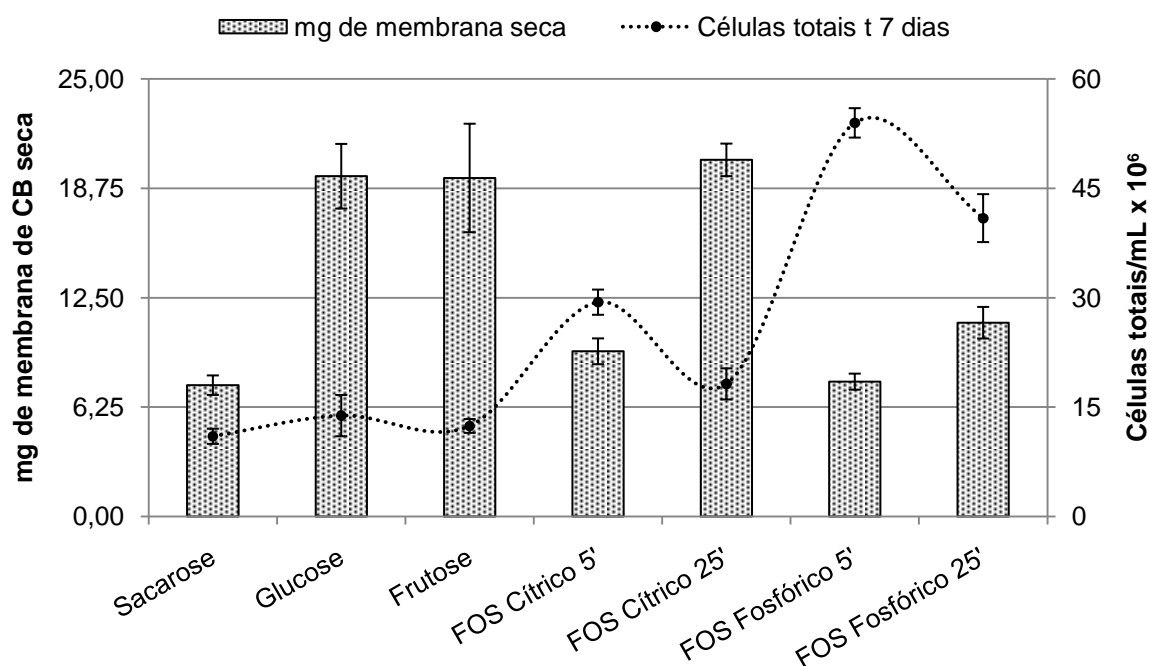


GRÁFICO 7 - RESULTADOS DE CRESCIMENTO E PRODUÇÃO DE MEMBRANAS DE CELULOSE EM CEPA PADRÃO DE *Gluconacetobacter xylinus* EM CULTIVOS UTILIZANDO DIFERENTES FONTES DE CARBONO

NOTA: Células totais (n = 6) e MG de membranas de celulose bacteriana (n = 3) com barras de desvio padrão.

5.3 PROCESSAMENTO DA CELULOSE BACTERIANA

As águas de lavagem analisadas por mensuração direta em espectrofotômetro em 260 e 280 nm mostram a redução significativa de ácidos nucleicos e proteínas, indicando que o processo de lavagem é efetivo para a remoção de resíduos celulares, como pode ser observado no GRÁFICO 8. Este procedimento de limpeza com espécies aniônicas já foi realizado anteriormente no LQBB (FONTANA,1997).

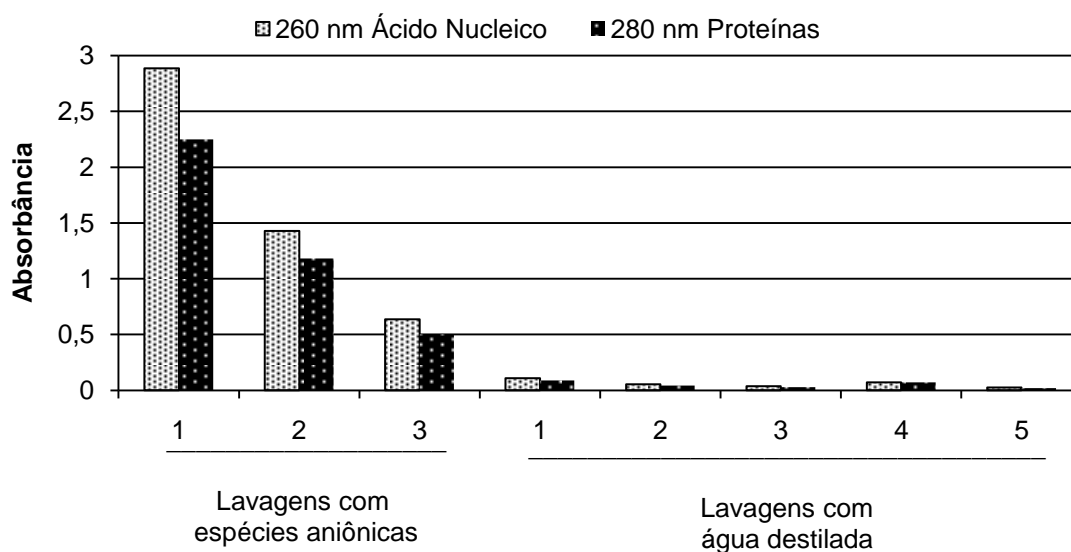


GRÁFICO 8 - ACOMPANHAMENTO DO PROCESSO DE LAVAGEM DAS MEMBRANAS DE CELULOSE BACTERIANA

As lavagens subseqüentes com água destilada servem para a remoção dos cátions e ânions livres, a fim de evitar possíveis interferências nas hidrólises. Isso foi verificado pela ausência de espuma após vigorosa agitação do erlenmeyer contendo as membranas após processo de limpeza (FIGURA 22).



FIGURA 22 - MEMBRANAS DE CELULOSE BACTERIANA APÓS PROCESSO DE LAVAGEM

Após as lavagens, as membranas foram secas em equipamento gel dryer, a 90°C, sob vácuo por 50 minutos. Ao final do processo obtêm-se folhas de CB, semelhantes a papel vegetal. Para confirmação da pureza da celulose obtida foi realizada uma análise de reflexão total atenuada (ATR) no infravermelho médio (FTIR) de tiras de CB.

Com o espectro obtido (GRÁFICO 9) podemos concluir que se trata de celulose pura, visto que as bandas são características de estiramentos da celulose e o gráfico está dentro do observado na literatura (CORTI,2004; GRANDE,2009).

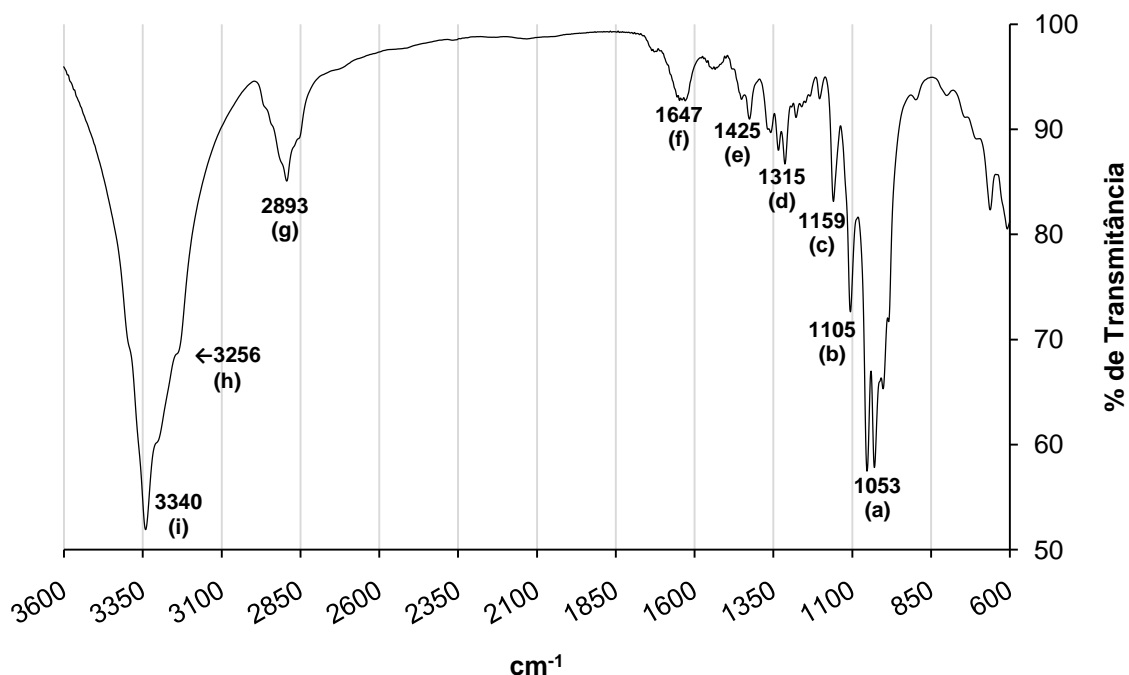


GRÁFICO 9 - ESPECTRO NO INFRAVERMELHO DA CELULOSE BACTERIANA POR ATR

As bandas em (a) 1053 e (b) 1105 cm⁻¹ correspondem ao estiramento da ligação CO atribuída aos alcoóis secundários e primários, respectivamente. A banda em (c) 1159 cm⁻¹ é atribuída ao estiramento assimétrico dos grupos COC éter alifático ($\beta 1 \rightarrow 4$). Os picos em (d) 1315 e (e) 1425 cm⁻¹ são atribuídos a deformação da ligação COH no plano de vibração e a ligação simétrica CH₂, respectivamente. O estiramento C-H dos carbonos primários e secundários estão representados no pico em (g) 2893 cm⁻¹, sendo de grande importância, já que neste pico ocorre a vibração de valência do grupo CH₂ do C6, sendo importante na análise de modificações da celulose. A intensa banda entre (i) 3600-3100 cm⁻¹ corresponde a diversos modos vibracionais dos grupamentos OH da celulose. Neste intervalo ocorre a vibração de OH livres, referente a água adsorvida, estiramento de OH intra-molecular e também devido à associação polimérica dos OH envolvidos nas ligações glicosídicas (CORTI,2004; GRANDE,2009).

Como descrito na literatura, a absorção no infra-vermelho sofre pequena interferência dependendo da estrutura molecular da celulose. Pico em 3240 cm^{-1} é atribuído a celulose I α enquanto sinal em 3270 cm^{-1} ocorre em celulose tipo I β . No espectro apresentado é possível perceber um pico em (h) 3256 cm^{-1} , indicando a predominância de celulose I α , característica de celulose produzida por organismos primitivos, como bactérias (DUMITRIU,1998).

5.4 TINGIMENTO COVALENTE DOS SUBSTRATES CELULÓSICOS

O tingimento covalente dos materiais celulósicos se deu por contato, com solução de Azul Brilhante de Remazol R (RBB ou Azure) 1% sob agitação por 24h na presença de NaOH 50 mM. Todos os materiais foram lavados exaustivamente por centrifugação (centrifuga Himac CR20B2) até completa remoção do corante não ligado.

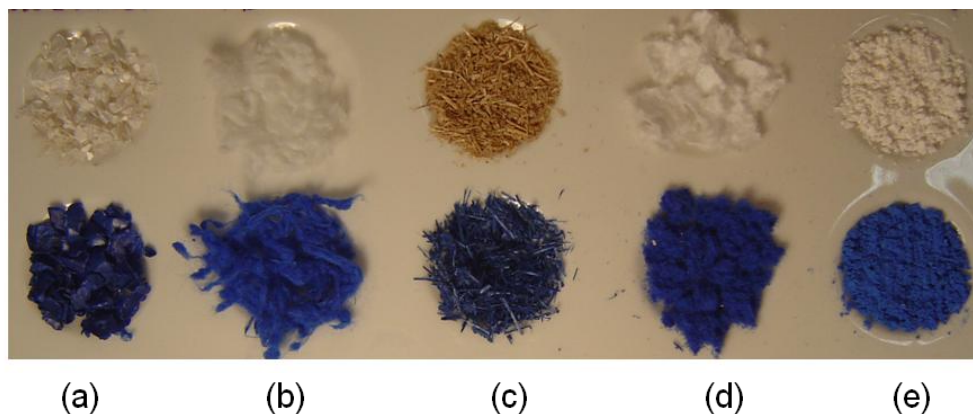


FIGURA 23 - SUBSTRATOS CELULÓSICOS ANTES E APÓS TINGIMENTO COM O CORANTE AZUL BRILHANTE DE REMAZOL R

NOTA: (a) Celulose Bacteriana, (b) Algodão hidrófilo, (c) Bagaço de cana-de-açúcar, (d) Papel de filtro Whatman n.1, e (e) Celulose micro-cristalina Avicel®, *in natura* e tingidos.

Após o tingimento, as membranas de CB foram novamente secas em gel dryer e então foram trituradas em liquidificador (FIGURA 23), mesmo as trituradas antes do tingimento, pois as membranas hidratam com a solução de corante e quando secas novamente formam uma estrutura única, porém irregular, devido às

características elásticas atribuídas ao grande número de ligações de hidrogênio que a celulose é capaz de formar (LYND,2002).

Os demais substratos celulósicos, alternativos a CB, passaram pelo mesmo processo para tingimento e secagem, porém sem a necessidade de ser re-triturado.

5.5 INCUBAÇÃO COM ENZIMAS CELULOLÍTICAS

5.5.1 Hidrólise comparativa dos diferentes substratos celulósicos

Os resultados das incubações de hidrólise comparativa dos diferentes substratos celulósicos (algodão, celulose micro-cristalina Avicel®, bagaço, CB, PF Whatman n. 1) tingidos ou não, foram expressos em porcentagem de glucose liberada no sobrenadante, calculados através da equação da reta obtida pela curva de calibração de glucose (item 5.1). Considerando 100% de hidrólise a liberação de glucose equivalente a 1,1 vezes o peso inicial (50 mg) do substrato, ou seja, 55 mg de açúcar redutor. Os substratos Azure-RBB também foram monitorados quanto a liberação de corante RBB R (item 5.1).

Para o substrato algodão hidrófilo, podemos perceber através do GRÁFICO 10, que os melhores resultados chegam a 16% para o substrato *in natura* – não tingido (40°C e proporção enzimática de celulasas 1:1 β -glucosidase) e apenas 4% para o algodão Azure-RBB (50°C e proporção enzimática de celulasas 2:1 β -glucosidase). Esta redução na porcentagem de hidrólise do Azure-RBB deve-se à inserção do corante na amostra, por impedimento estérico, como já foi descrito por (MINORU,2005) e com isso reduz significativamente a atividade enzimática, principalmente das CBH que atuam liberando principalmente celobiose, afetando o sinergismo das celulasas.

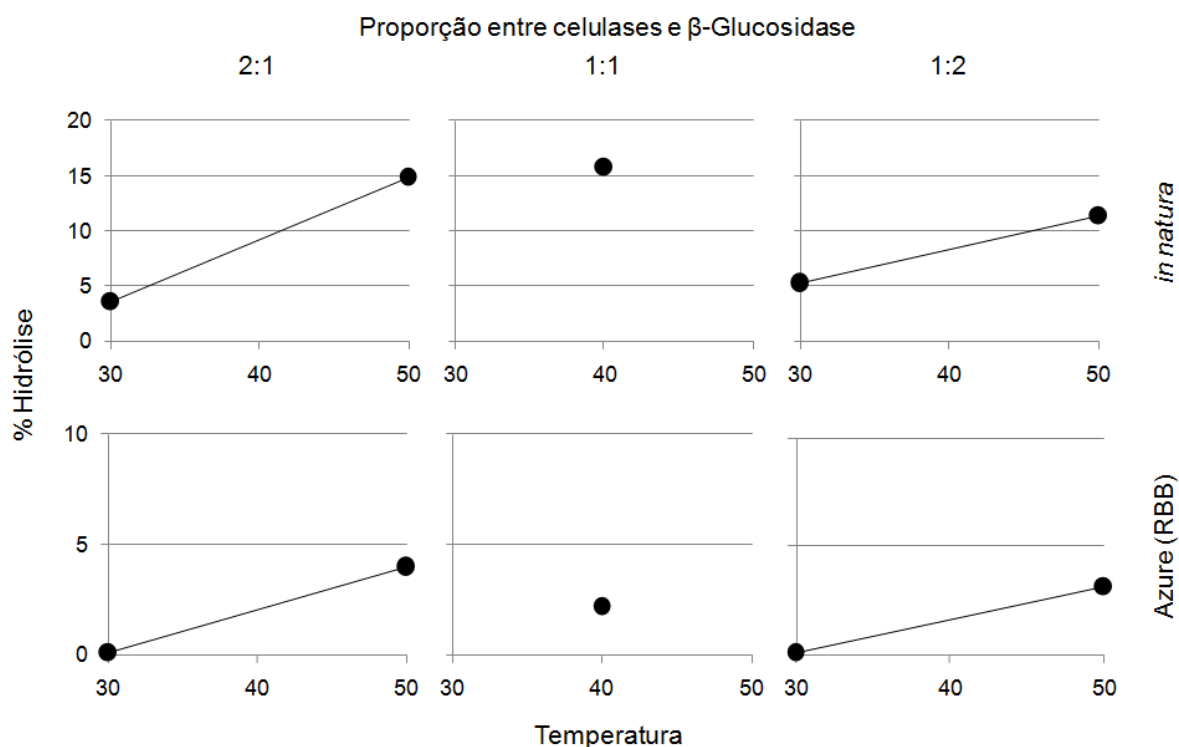


GRÁFICO 10 - RESULTADOS DO PLANEJAMENTO FATORIAL PARA O ALGODÃO HIDRÓFILO IN NATURA E AZURE-RBB

Para a celulose micro-cristalina (Avicel®) observamos através do GRÁFICO 11, que os resultados são mais expressivos quando comparado ao algodão hidrófilo, chegando a 52,6% de hidrólise para o substrato *in natura* (40°C e proporção enzimática de celulases 1:1 β-glucosidase) e 40,1% para o Avicel® Azure-RBB (50°C e proporção enzimática de celulases 2:1 β-glucosidase). Também foi possível observar que houve redução na hidrólise do substrato tingido com RBB. Neste experimento, houve maior complexidade para execução, uma vez que este substrato se apresenta na forma pulverizada, turvando o meio hidrolítico, havendo a necessidade de implantar uma etapa adicional de centrifugação preliminar à mensuração dos açúcares redutores e corante.

A CB apresentou os melhores resultados, chegando próximo da hidrólise completa (95,8%) para o substrato *in natura* (40°C e proporção enzimática de celulases 1:1 β-glucosidase), como é possível observar no GRÁFICO 12. Este resultado confirma a propriedade atribuída a CB de rápida hidrólise com microrganismos que possuam complexos celulolíticos, ou enzimas isoladas (FONTANA,1997). Para o substrato CB Azure-RBB também foi observada uma

redução na hidrólise, sendo que o melhor resultado foi de 38,7% (50°C e proporção enzimática de celulases 2:1 β -glucosidase).

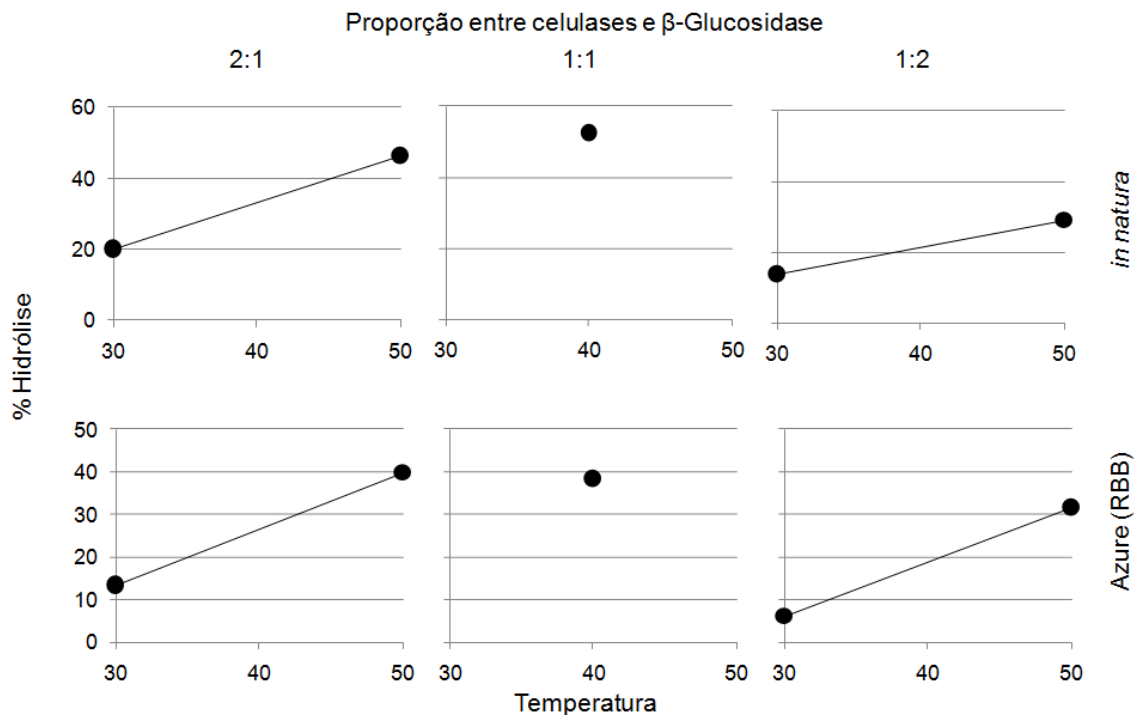


GRÁFICO 11 - RESULTADOS DO PLANEJAMENTO FATORIAL PARA CELULOSE MICROCRISTALINA (AVICEL) IN NATURA E AZURE-RBB

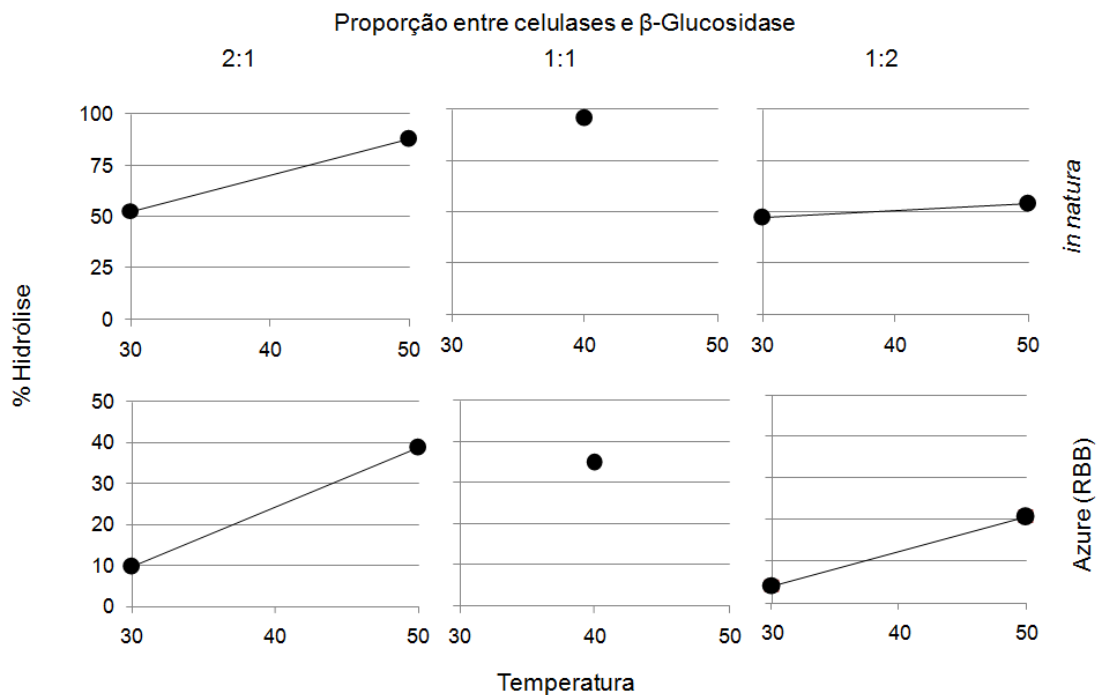


GRÁFICO 12 - RESULTADOS DO PLANEJAMENTO FATORIAL PARA CELULOSE BACTERIANA IN NATURA E AZURE-RBB

Para o PF Whatman n.1, que é o substrato celulósico de referência mundial na maior parte dos testes de atividade enzimática de celulases, pode-se perceber bons resultados de hidrólise, atingindo 62,1% para o substrato *in natura* (40°C e proporção enzimática de celulases 1:1 β -glucosidase) e 21,4% de hidrólise para o substrato PF Whatman n.1 Azure-RBB (50°C e proporção enzimática de celulases 2:1 β -glucosidase), que novamente apresentou redução na hidrólise (GRÁFICO 13).

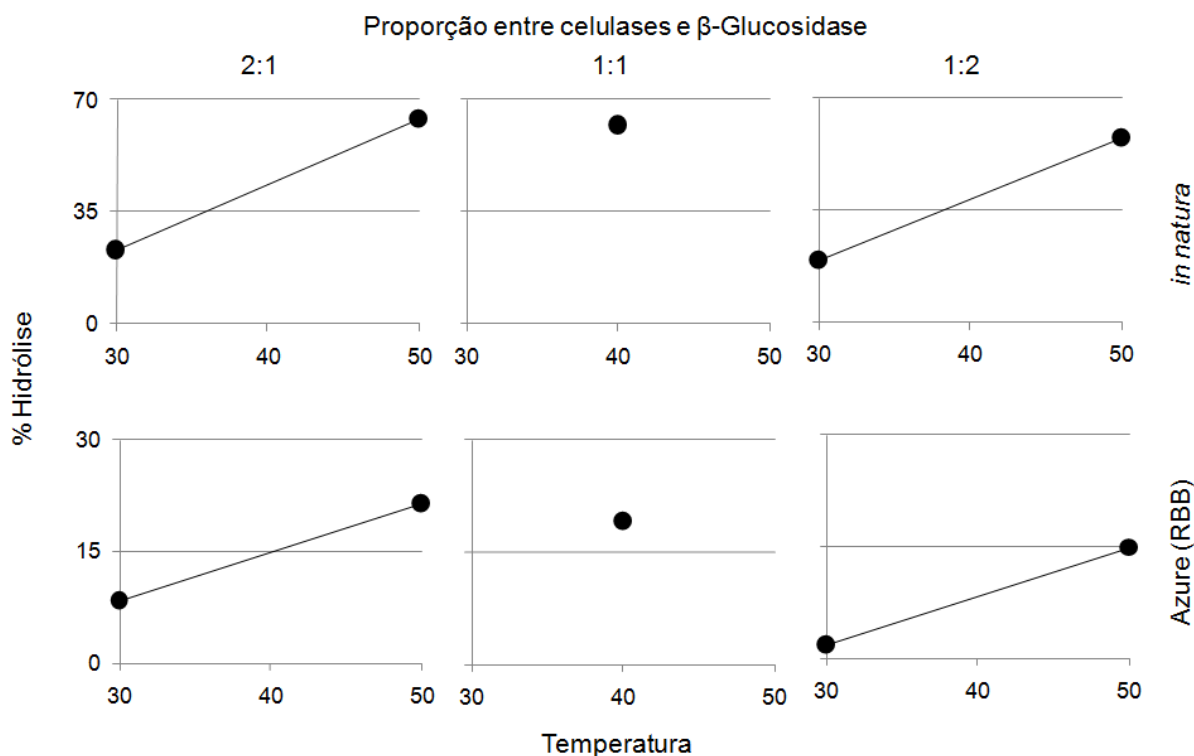


GRÁFICO 13 - RESULTADOS DO PLANEJAMENTO FATORIAL PARA PAPEL DE FILTRO WHATMAN N. 1 IN NATURA E AZURE-RBB

Pode-se perceber que para todos os ensaios apresentados as condições ideais de hidrólise se repetem, tanto para os substratos *in natura*, 40 °C e proporção enzimática 1:1 de celulases e β -glucosidase, referente a duplicata do ponto central (ensaios 5 e 6), quanto para os substratos Azure-RBB, 50 °C e proporção enzimática 2:1 de celulases e β -glucosidase, referente ao ensaio 1.

O bagaço de cana-de-açúcar apresentou resultados diferentes quando comparado aos demais substratos celulósicos. No GRÁFICO 14, é possível observar que houve uma inversão de condições ótimas para os substratos tingidos e *in natura*, chegando a apenas 0,8% para o substrato *in natura* (50°C e proporção enzimática de celulases 2:1 β -glucosidase) e 7,2% de hidrólise para o substrato

Azure-RBB (40°C e proporção enzimática de celulases 1:1 β -glucosidase). O bagaço foi o único a aumentar a porcentagem de hidrólise para o substrato tingido. Isto provavelmente ocorre devido ao fato de o processo de tingimento ser realizado na presença de base forte (NaOH) como agente catalisador, o que pode levar a um processo de deslignificação do bagaço de cana-de-açúcar, facilitando o acesso das enzimas ao verdadeiro substrato, a celulose, ressaltando a necessidade de tratamento prévio do material. Este processo de deslignificação com meio alcalino já está bem descrito na literatura (ELTON,1989; KLEINERT,1966).

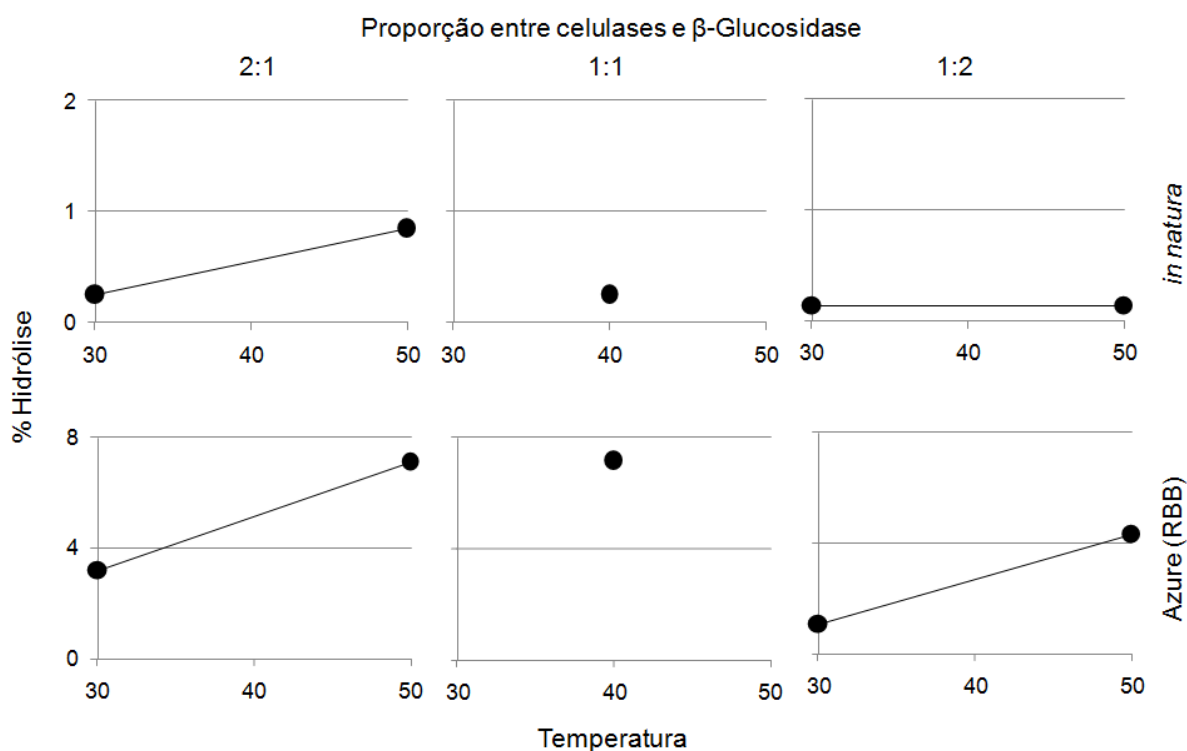


GRÁFICO 14 - RESULTADOS DO PLANEJAMENTO FATORIAL PARA BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR IN NATURA E AZURE-RBB

No GRÁFICO 15, estão apresentadas as maiores porcentagens de hidrólise obtidas para todos os substratos, *in natura* e Azure-RBB. Como já foi demonstrado anteriormente, a CB *in natura* apresentou a melhor hidrólise enzimática no tempo de 72 h, seguido pelo PF Whatman n.1 *in natura*. Comparativamente, não existe diferença estatística entre a CB Azure-RBB e a celulose micro-cristalina Avicel® Azure-RBB, comercialmente disponível no mercado, porém, esta última requer etapa extra de centrifugação do hidrolisado.

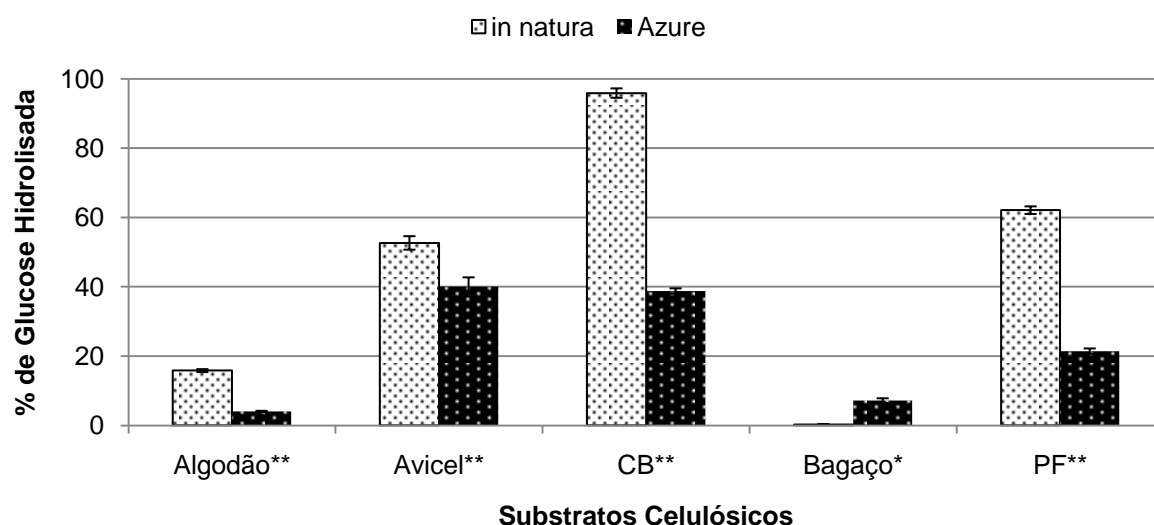


GRÁFICO 15 - COMPARAÇÃO DA HIDRÓLISE DOS SUBSTRATOS CELULÓSICOS *in natura* E TINGIDOS

NOTA: Condições otimizadas de: *in natura* 40 °C e proporção enzimática de 1:1; e para Azure, 50 °C e proporção 2:1. (*) $p < 0,005$ ou (**) $p < 0,001$ para teste *t* bicaudal entre substrato *in natura* e Azure-RBB. Barras indicando desvio padrão (n = 4).

A diferença de resposta para os substratos *in natura* e Azure-RBB, foi comprovada estatisticamente através de teste *t* pareado (item 4.1.8.2), sendo possível observar a clara redução na resposta para os substratos tingidos, exceto bagaço de cana-de-açúcar. Isto se deve provavelmente ao fato do corante RBB apresentar alto peso molecular (P.M. 626,54 g/Mol) comparado as unidades de glucose (P.M. 180,16 g/Mol), causando um provável impedimento estérico para o ataque das enzimas celulolíticas, causando redução na atividade enzimática como já foi observada em trabalho utilizando algodão Azure-RBB (MINORU,2005).

A correlação entre açúcares redutores e o corante RBB liberados durante hidrólise foi analisada seguindo teste de correlação de Pearson (item 4.1.8.3), que é amplamente empregada em diversas áreas para correlacionar duas variáveis através de uma relação linear (AL-GHARABLI,2009; MYUNG-HEE,2010; PORTA,2007). Os resultados apresentados na TABELA 5 mostram que as correlações mais significativas (99% de significância) foram para CB e PF, com intensidade de correlação alta e muito alta, respectivamente, apesar das variações de temperatura e proporção enzimática. Os demais substratos apresentaram correlação moderada (80%) para algodão, baixa (50%) para Avicel® e muito baixa (menor que 50%) para o bagaço de cana-de-açúcar.

TABELA 5 - COEFICIENTES DE CORRELAÇÃO DE PEARSON ENTRE QUANTIDADE DE AÇÚCAR REDUTOR E CORANTE LIBERADO DURANTE HIDRÓLISE COMPARATIVA DE DIFERENTES SUBSTRATOS AZURE-RBB

Substrato Azure-RBB	Coeficiente de correlação de Pearson	Valor do teste <i>t</i>	Valor de <i>t</i> > <i>t</i> tabelado com diferentes níveis de significância			
			0,01	0,05	0,2	0,5
			3,4995	2,3646	1,4149	0,7111
Algodão	0,5268	1,6398			X	
Avicel	0,3526	0,9969				X
Bagaço	0,2403	0,6550				
CB	0,8539	4,3410	X			
PF	0,9110	5,8444	X			

NOTA: (CB) celulose bacteriana; (PF) papel de filtro Whatman n.1; *t* tabelado com grau de liberdade (n-2) = 7 – Todos os substratos obtiveram correlação positiva, entretanto o valor do teste *t* não foi significativo para o bagaço de cana.

Como a CB e o PF apresentaram as melhores correlações para os substratos Azure-RBB, e também as maiores taxas de hidrólise tanto para *in natura* e Azure-RBB, estes substratos foram utilizados nas análises estatísticas de planejamento fatorial (item 4.1.8.1).

TABELA 6 - EFEITOS DE PRIMEIRA E SEGUNDA ORDEM DO PLANEJAMENTO FATORIAL DE OTIMIZAÇÃO PARA A CELULOSE BACTERIANA E O PAPEL DE FILTRO WHATMAN N.1

Amostras		Efeitos de Primeira Ordem		Efeito de Segunda Ordem
		Temperatura	Proporção Enzimática	Temperatura X Proporção Enzimática
CB	IN	20,929	19,673	14,172
	AZ	22,843	11,660	6,219
PF	IN	39,736	4,933	1,405*
	AZ	13,066	6,488	-0,030*

NOTA: (CB) celulose bacteriana; (PF) papel de filtro Whatman n.1; (IN) *in natura*; (AZ) Azure. (*) Alteração inferior a estimativa de erro calculada.

A estimativa de erro, multiplicada pelo valor de *t* tabelado ($t_{0,025;4} = 2,776$) para significância de 95% em modelo bicaudal, foi utilizada para validar os efeitos de primeira e segunda ordem. Para CB o valor encontrado foi de 6,82 para o substrato *in natura* e 0,65 para o Azure-RBB. Observando a TABELA 6, verifica-se que todos os efeitos calculados foram significativos (> 6,82 para CB *in natura* ou > 0,65 para CB Azure-RBB) o que leva a conclusão que a alteração de qualquer uma das variáveis, tanto temperatura, quanto a mudança na proporção enzimática, assim como a interação entre estas variáveis, levam a um aumento na porcentagem de hidrólise. Para o PF Whatman n.1 a estimativa de erro foi de 1,46 para o substrato *in natura* e 1,84 para o mesmo substrato Azure-RBB. Observa-se que a alteração da temperatura e proporção enzimática foram significativas, entretanto para esta última

em menor intensidade de aumento de resposta. Porém, a interação entre as variáveis (efeitos de segunda ordem) não foi significativa para esse substrato.

Para a tentativa de enquadrar a otimização em um modelo linear ou quadrático, os dados foram analisados no *software* Bruns, o qual calcula a análise de variância (ANOVA) para cada modelo, previsão de resposta e gráfico de resíduos.

Observado as TABELAS 7, 8, 9 e 10 contendo a ANOVA para a CB *in natura* e CB Azure-RBB, e para o PF Whatman n.1 *in natura* e PF Azure-RBB, respectivamente, verificamos que o modelo linear não é válido para nenhum dos substratos, considerando que os valores obtidos pela divisão das médias quadráticas da regressão pelos resíduos foram menores que o F5% tabelado ($F_{2,3} = 9,55$) e os valores obtidos pela divisão das médias quadráticas da regressão pelo erro puro foram maiores que o F5% tabelado ($F_{3,1} = 215,7$).

TABELA 7 - ANOVA PARA AJUSTE LINEAR DO PLANEJAMENTO FATORIAL PARA CELULOSE BACTERIANA *in natura*

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Teste F
Regressão	825,03	2	412,51	0,66
Resíduos	1865,83	3	621,94	
Falta de Ajuste	1864,03	2	932,01	516,35
Erro Puro	1,80	1	1,80	
Total	2690,86	5		
% de Variância Explicada = 30,66				
% Máxima de Variância Explicável = 99,93				

TABELA 8 - ANOVA PARA AJUSTE LINEAR DO PLANEJAMENTO FATORIAL PARA CELULOSE BACTERIANA AZURE-RBB

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Teste F
Regressão	657,84	2	328,92	2,4817
Resíduos	397,61	3	132,54	
Falta de Ajuste	397,53	2	198,76	2484,54
Erro Puro	0,08	1	0,08	
Total	1055,45	5		
% de Variância Explicada = 62,32				
% Máxima de Variância Explicável = 99,99				

TABELA 9 - ANOVA PARA AJUSTE LINEAR DO PLANEJAMENTO FATORIAL PARA PAPEL DE FILTRO WHATMAN N.1 *in natura*

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Teste F
Regressão	1604,56	2	802,28	4,08
Resíduos	589,98	3	196,66	
Falta de Ajuste	588,70	2	294,35	229,96
Erro Puro	1,28	1	1,28	
Total	2194,55	5		
% de Variância Explicada = 73,12				
% Máxima de Variância Explicável = 99,94				

TABELA 10 - ANOVA PARA AJUSTE LINEAR DO PLANEJAMENTO FATORIAL PARA PAPEL DE FILTRO WHATMAN N.1 AZURE-RBB

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Teste F
Regressão	211,90	2	105,95	4,27
Resíduos	74,51	3	24,84	
Falta de Ajuste	74,50	2	37,25	7450,25
Erro Puro	0,005	1	0,005	
Total	286,41	5		

% de Variância Explicada = 73,98
% Máxima de Variância Explicável = 99,99

Com o valor das respostas obtidas para cada ensaio, menos o valor da resposta prevista pela tentativa de ajustar em um modelo linear obtemos os resíduos de cada ensaio. Plotando esses valores em um gráfico, GRÁFICO 16, podemos perceber que estes não são representados por uma reta, e que esta distribuição não parece ser aleatória, sugerindo um modelo quadrático.

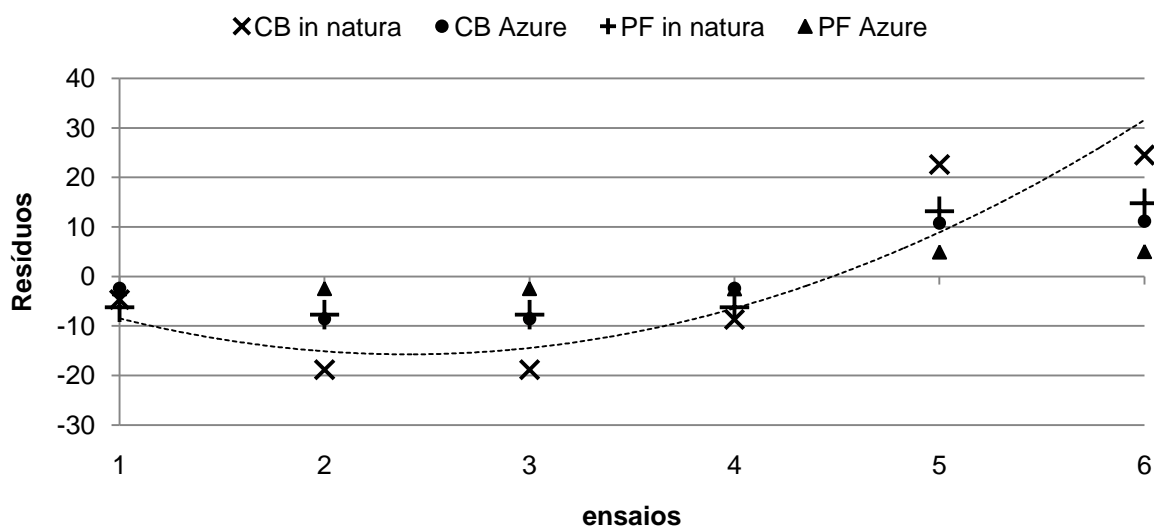


GRÁFICO 16 - RESÍDUOS OBTIDOS PARA AJUSTE LINEAR DO PLANEJAMENTO FATORIAL DE OTIMIZAÇÃO DE HIDRÓLISE UTILIZANDO DIFERENTES SUBSTRATOS CELULÓSICOS

NOTA: (CB) Celulose bacteriana, (PF) Papel de filtro Whatman n.1.

Como o modelo linear se mostrou insatisfatório, a continuidade se deu apenas com a CB, para tentativa de ajuste de um modelo quadrático, seguindo o planejamento estrela. Foram construídas novas matrizes de dados para a CB *in natura* e Azure-RBB GRÁFICO 17 e realizado a ANOVA para o modelo quadrático.

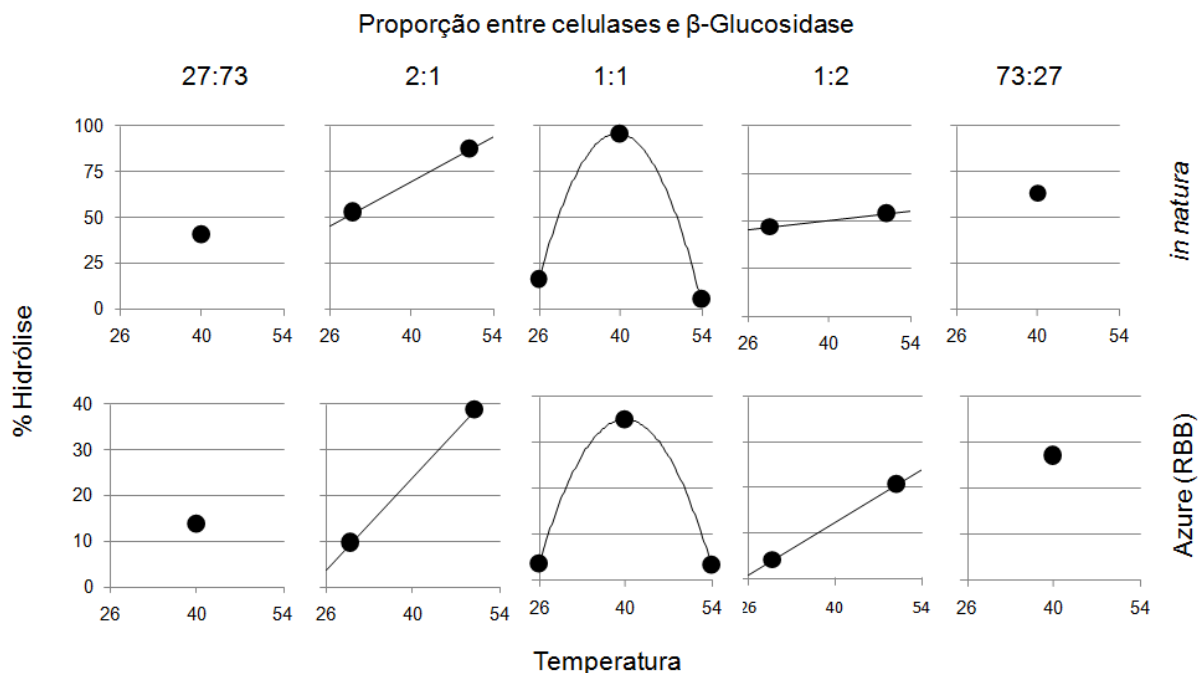


GRÁFICO 17 - RESULTADOS DO PLANEJAMENTO FATORIAL EM ESTRELA PARA CELULOSE BACTERIANA *in natura* E AZURE-RBB

Observado análises de variância (TABELA 11 e 12) para a CB *in natura* e Azure-RBB, verificamos que o modelo quadrático também não é válido para nenhum dos substratos, significando não ser possível gerar uma equação de superfície de resposta válida para esse intervalo de dados.

TABELA 11 - ANOVA PARA AJUSTE QUADRÁTICO DO PLANEJAMENTO FATORIAL ESTRELA PARA CELULOSE BACTERIANA *in natura*

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Teste F
Regressão	6576,28	5	1315,26	2,47
Resíduos	2133,59	4	533,40	
Falta de Ajuste	2131,76	3	710,59	
Erro Puro	1,83	1	1,83	388,34
Total	8709,87	9		

% de Variância Explicada = 75,50
% Máxima de Variância Explicável = 99,98

TABELA 12 - ANOVA PARA AJUSTE QUADRÁTICO DO PLANEJAMENTO FATORIAL ESTRELA PARA CELULOSE BACTERIANA AZURE-RBB

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Teste F
Regressão	1442,70	5	288,54	3,30
Resíduos	349,25	4	87,31	
Falta de Ajuste	348,80	3	116,26	
Erro Puro	0,46	1	0,46	253,90
Total	1791,96	9		

% de Variância Explicada = 80,51
% Máxima de Variância Explicável = 99,97

Observando o gráfico de resíduos para o modelo quadrático, GRÁFICO 12, percebe-se que a distribuição parece ser aleatória. Significando que, para obter um modelo com equação quadrática válida, seria necessário realizar um novo planejamento fatorial, utilizando valores mais próximos das condições com as melhores respostas, evitando assim possíveis interferências, como a possível a desnaturação das enzimas pela permanência em altas temperaturas por um longo período.

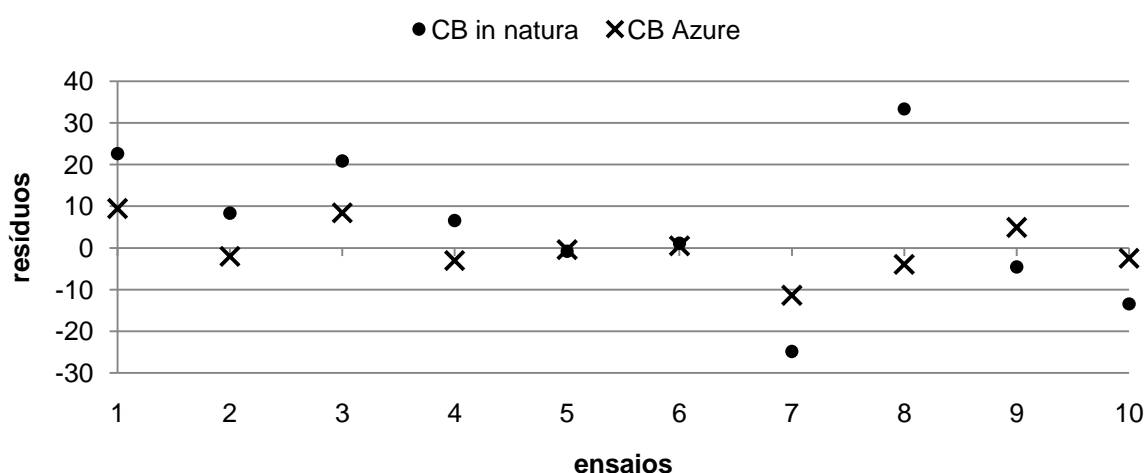


GRÁFICO 18 - RESÍDUOS OBTIDOS PARA AJUSTE QUADRÁTICO DO PLANEJAMENTO FATORIAL ESTRELA DE OTIMIZAÇÃO DE HIDRÓLISE UTILIZANDO DIFERENTES SUBSTRATOS CELULÓSICOS

NOTA: (CB) Celulose bacteriana.

Apesar da ANOVA ser inválida, plotando o gráfico de superfície de resposta para CB *in natura* e CB Azure-RBB, podemos observar que o ponto onde os GRÁFICOS 19 e 20, respectivamente, atingem seu ápice são próximos aos pontos onde foram obtidas as melhores respostas (proporção enzimática 1:1 de celulasas e β -glucosidase e temperatura de 40°C, para o substrato *in natura*, e proporção enzimática celulasas 2:1 β -glucosidase e temperatura de 50°C para o substrato Azure-RBB).

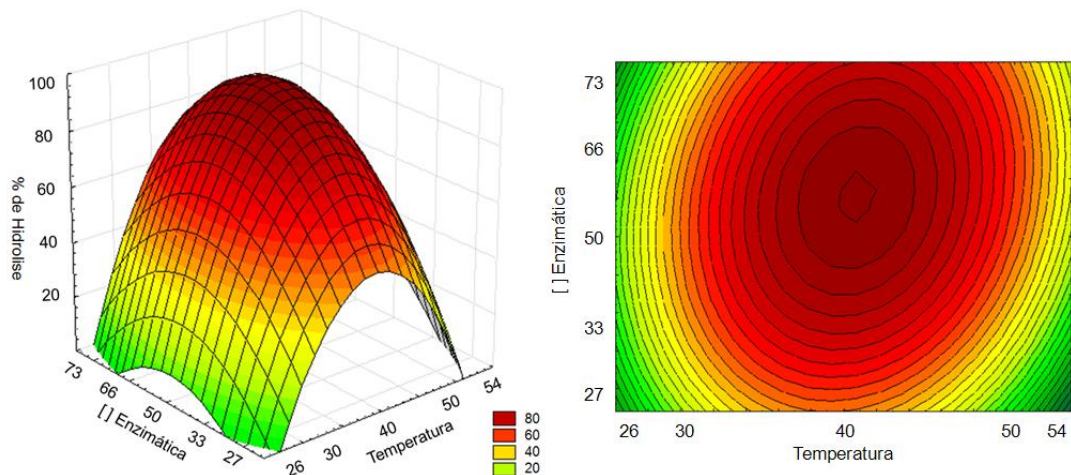


GRÁFICO 19 - SUPERFÍCIE DE RESPOSTA OBTIDA PARA AJUSTE QUADRÁTICO DO PLANEJAMENTO FATORIAL ESTRELA DE OTIMIZAÇÃO DE HIDRÓLISE DA CELULOSE BACTERIANA *in natura*

NOTA: inválido pela ANOVA

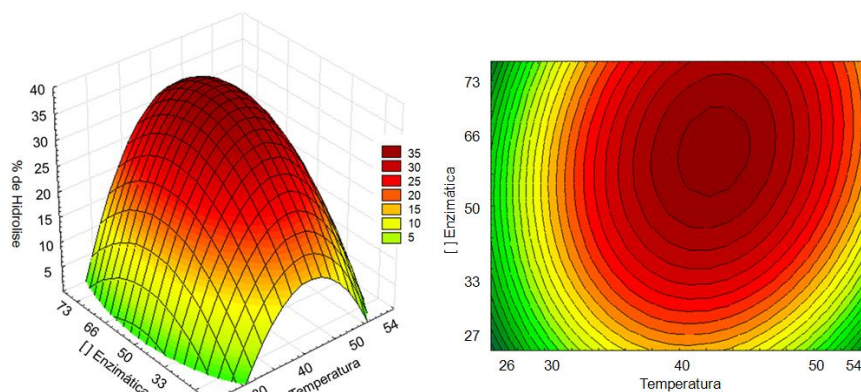


GRÁFICO 20 - SUPERFÍCIE DE RESPOSTA OBTIDA PARA AJUSTE QUADRÁTICO DO PLANEJAMENTO FATORIAL ESTRELA DE OTIMIZAÇÃO DE HIDRÓLISE DA CELULOSE BACTERIANA AZURE-RBB

NOTA: inválido pela ANOVA

5.5.2 Determinação do potencial de sacarificação das enzimas

Os resultados da determinação do potencial de sacarificação das enzimas, comparando CB e PF, provaram que a CB é o melhor substrato para os ensaios de complexos celulolíticos, tingido ou não, como podemos ver no GRÁFICO 21. Para liberar 2 mg de glucose (açúcar redutor) são necessários: 1,23 (\pm 0,14) μ L/mL de

enzimas para a CB *in natura*; 2,43 (\pm 0,06) μ L/mL para a CB Azure-RBB; 3,61 (\pm 0,30) μ L/mL para PF *in natura*; e 4,48 (\pm 0,10) μ L/mL para PF Azure-RBB.

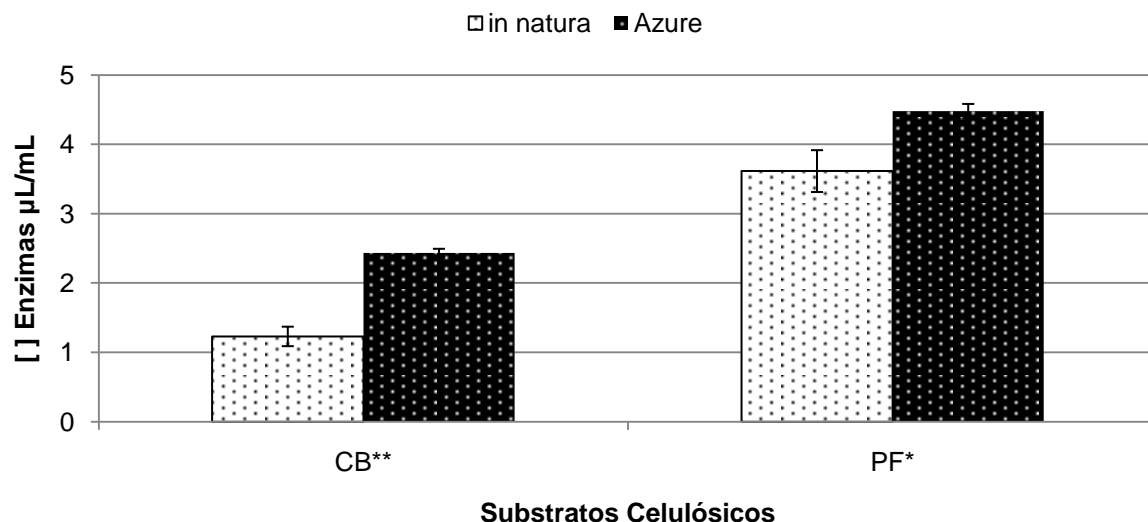


GRÁFICO 21 - ENSAIO COMPARATIVO DE DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL DE SACARIFICAÇÃO DAS ENZIMAS COM DIFERENTES SUBSTRATOS

NOTA: (CB) Celulose Bacteriana; (PF) – Papel de filtro Whatman n.1; (*) $p < 0,02$ ou (**) $p < 0,005$ para Teste t pareado bicaudal. Barras indicando desvio padrão ($n = 7$).

A atividade enzimática reduziu 49,38% para a CB Azure-RBB e 19,42% para o PF Azure-RBB comparativamente com seus substratos *in natura*. Como já exemplificado anteriormente, o RBB causa um impedimento estérico para o ataque enzimático. Entretanto, se compararmos a eficiência hidrolítica da CB com a do PF, vemos uma redução de 65,93% na quantidade de enzima necessária para liberar 2 mg de glucose para o substrato *in natura* e 32,69% para o Azure-RBB. Comparando os todos os resultados através do teste t pareado, houve diferença significativa entre os substratos. Estes resultados demonstram que a CB Azure-RBB pode ser utilizada com grande eficiência na detecção de complexos celulolíticos.

TABELA 13 - COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO DE PEARSON ENTRE QUANTIDADE DE AÇÚCAR REDUTOR E CORANTE RBB EM TESTE DE POTENCIAL DE SACARIFICAÇÃO ENZIMÁTICO

Substrato Azure-RBB	Coeficiente de correlação de Pearson	Valor do teste t	Valor de $t > t$ tabelado com diferentes níveis de significância			
			0,01	0,05	0,2	0,5
			4,0322	2,5706	1,4759	0,7267
CB	0,9950	22,2767	X			
PF	0,9570	7,3768	X			

NOTA: (CB) celulose bacteriana; (PF) papel de filtro Whatman n.1. t tabelado com grau de liberdade ($n-2$) = 5. Os dois substratos apresentaram correlação positiva

Na TABELA 13, estão apresentados os dados do teste de correlação de Pearson para os substratos Azure-RBB, relacionando a quantidade de glucose e RBB em $\mu\text{Mol/ensaio}$.

Os resultados para ambos os substratos, CB e PF, mostraram correlação muito alta e com nível de significância de 99%. Variando apenas a concentração enzimática, as correlações apresentaram excelentes resultados para 1 hora de ensaio com temperatura de 50 °C.

5.5.3 Otimização do processo de hidrólise de celulose bacteriana

A hidrólise de celulose bacteriana, como já demonstrado anteriormente, não segue um modelo linear, por este motivo a otimização do processo de hidrólise de celulose bacteriana durante 1 hora, foi realizado seguindo planejamento fatorial estrela. As respostas obtidas estão apresentadas em porcentagem de hidrólise, como é possível observar no GRÁFICO 22.

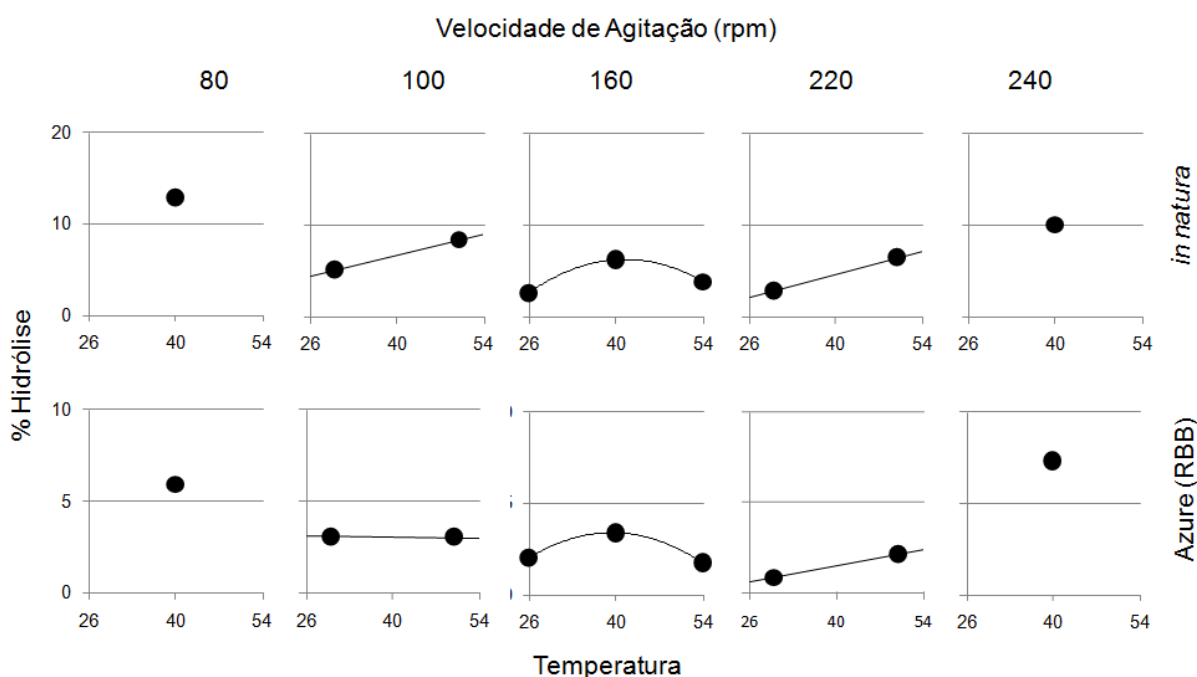


GRÁFICO 22 - OTIMIZAÇÃO DO PLANEJAMENTO FATORIAL ESTRELA PARA CELULOSE BACTERIANA IN NATURA E AZURE-RBB

As melhores porcentagens de hidrólise para CB *in natura* foram com temperatura de 50 °C e agitação na velocidade 2 (ensaio 10) e para CB Azure-RBB, 50 °C e velocidade 6 (ensaio 8).

TABELA 14 - EFEITOS DE PRIMEIRA E SEGUNDA ORDEM DO PLANEJAMENTO FATORIAL DE OTIMIZAÇÃO PARA A CELULOSE BACTERIANA

Amostras		Efeitos de Primeira Ordem		Efeito de Segunda Ordem
		Temperatura	Agitação	Temperatura X Agitação
CB	IN	3,4895	2,1555	-0,1625*
	AZ	0,6105	1,5575	-0,6605

NOTA: (CB) celulose bacteriana; (IN) *in natura*; (AZ) Azure. (*) Alteração inferior a estimativa de erro calculada.

A estimativa de erro, multiplicada pelo valor de T tabelado ($T_{0,025;4} = 2,776$), resultou no valor de 0,6520 e 0,1833, para a celulose bacteriana *in natura* e Azure-RBB, respectivamente. Observando a TABELA 14, verifica-se que para CB *in natura* as variações da temperatura e agitação foram significativas, sendo a primeira a variável que mais interfere nas porcentagens de hidrólise. Não houve correlação para o efeito de segunda ordem, entre temperatura e agitação. Para o substrato Azure-RBB, a velocidade de agitação demonstra ser mais determinante para o aumento da porcentagem de hidrólise, comparada aos demais efeitos.

Analisando a variância (ANOVA) para cada modelo através do *software* Bruns, obtemos as TABELAS 15 e 16 para a CB *in natura* e Azure-RBB, respectivamente. Verifica-se que o modelo quadrático não é válido para nenhum dos substratos, considerando o valor tabela de F5% de $F_{5,4} = 6,26$ e $F_{4,1} = 224,6$.

TABELA 15 - ANOVA PARA AJUSTE DO PLANEJAMENTO FATORIAL DE OTIMIZAÇÃO PARA CELULOSE BACTERIANA *in natura*

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Teste F
Regressão	77,8132	5	15,5626	12,3817
Resíduos	17,3582	4	4,3396	
Falta de Ajuste	16,9032	3	5,6344	
Erro Puro	0,4551	1	0,4551	
Total	95,1714	9		
% de Variância Explicada = 81,7611				
% Máxima de Variância Explicável = 99,5219				

TABELA 16 - ANOVA PARA AJUSTE DO PLANEJAMENTO FATORIAL DE OTIMIZAÇÃO PARA CELULOSE BACTERIANA AZURE-RBB

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Teste F
Regressão	25,9037	5	5,1807	2,5815
Resíduos	8,0274	4	2,0068	
Falta de Ajuste	8,0183	3	2,6728	293,3063
Erro Puro	0,0091	1	0,0091	
Total	33,9310	9		

% de Variância Explicada = 76,3421
 % Máxima de Variância Explicável = 99,9731

Observando o GRÁFICO 23, que corresponde aos resíduos, percebe-se que a distribuição não é aleatória, não sendo possível obter uma equação quadrática válida. Portanto, o próximo passo seria realizar um novo planejamento fatorial, utilizando valores mais próximos das condições que apresentaram as melhores respostas.

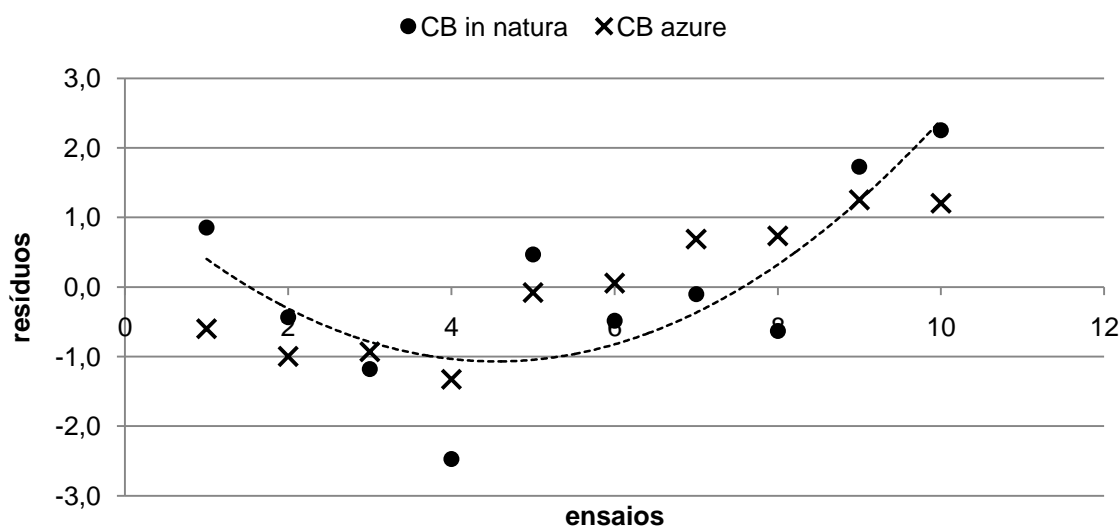


GRÁFICO 23 - RESÍDUOS OBTIDOS PARA AJUSTE QUADRÁTICO DO PLANEJAMENTO FATORIAL ESTRELA DE OTIMIZAÇÃO DE HIDRÓLISE PARA CELULOSE BACTERIANA *in natura* E AZURE-RBB

Embora a equação da ANOVA ser inválida, plotando os gráficos de superfície de resposta para CB *in natura* e CB Azure-RBB, é possível observar nos GRÁFICOS 24 e 25, que existem dois pontos ótimos. Os ápices são com temperatura de 50 °C, porém com as velocidades extremas (mínima e máxima) para ambos os substratos. O efeito da velocidade de agitação durante hidrólise de substratos celulósicos foi avaliada em outros trabalhos como o que utiliza resíduos lignocelulósicos de grãos provenientes da indústria cervejeira (MUSSATO,2008), onde a variação da

velocidade de 100 para 200 rpm, reduz de 5-10% a porcentagem de hidrólise. Cada substrato celulósico requer uma velocidade de agitação ótima, que garanta adequada interação com as enzimas celulolíticas. Velocidades excessivas (que formem bolhas de ar no meio hidrolítico) mostram reduzir a atividade enzimática, por inativação de grupos essenciais para a catálise e/ou conformação da enzima, porém alguma velocidade é necessária para facilitar a transferência de massa entre os sítios catalíticos das enzimas e seu substrato.

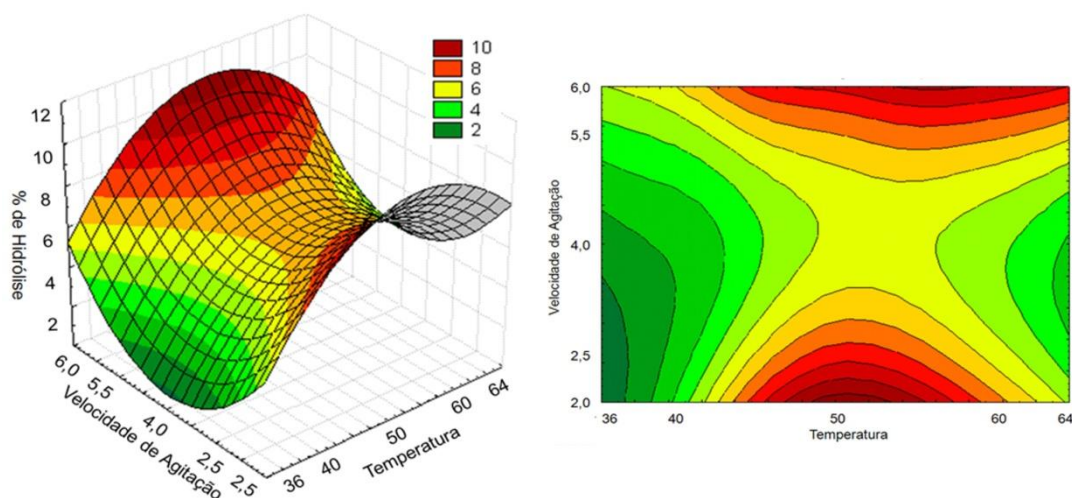


GRÁFICO 24 - SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA PLANEJAMENTO FATORIAL EM ESTRELA PARA OTIMIZAÇÃO DE HIDRÓLISE PARA CELULOSE BACTERIANA IN NATURA
NOTA: inválido pela ANOVA

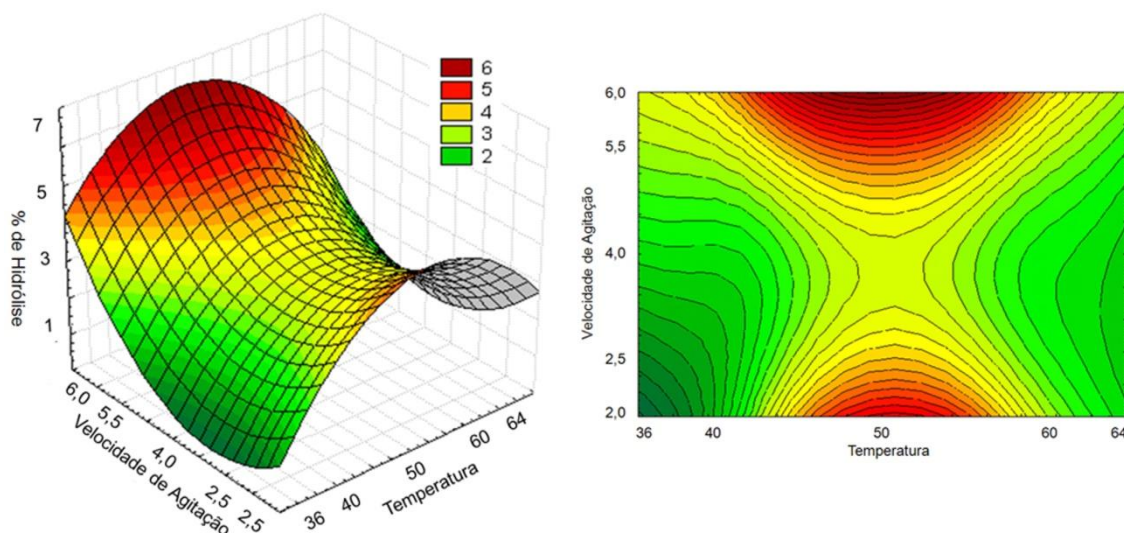


GRÁFICO 25 - SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA PLANEJAMENTO FATORIAL EM ESTRELA PARA OTIMIZAÇÃO DE HIDRÓLISE PARA CELULOSE BACTERIANA AZURE-RBB
NOTA: inválido pela ANOVA

O coeficiente de correlação de Pearson dos ensaios utilizando CB Azure-RBB, foi de $r = 0,7839$, indicando uma correlação alta entre os valores de glucose e corante RBB liberado. O valor do teste t foi de 3,5710, maior que o valor de t tabelado de 3,5534, com nível de confiança de 99%.

5.5.4 Cinética hidrolítica da celulose bacteriana Azure-RBB

Comparando os resultados em mg/mL, dos açúcares redutores (método do DNS), analisados em absorbância de 540 nm e a leitura após centrifugação de 1 mL do hidrolisado em 593 nm, é possível perceber que a liberação de RBB possui boa correlação com a liberação de glucose e outros açúcares redutores, como pode ser visto no GRÁFICO 26.

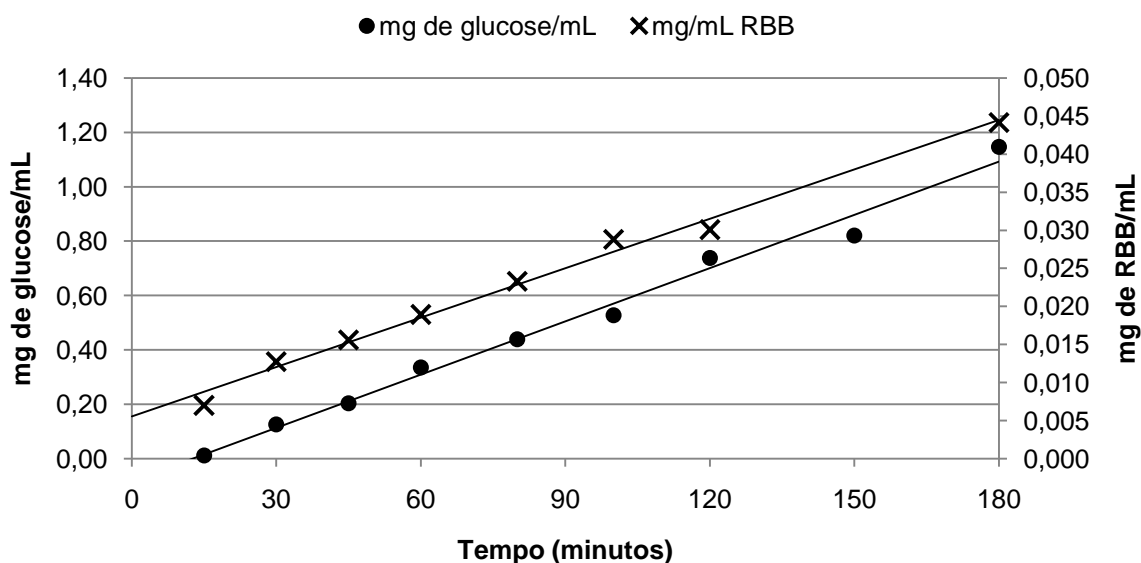


GRÁFICO 26 - CORRELAÇÃO DE mg GLUCOSE/mL OBTIDAS PELO MÉTODOS DNS VS. ABSORBÂNCIA DO CORANTE LIBERADO DURANTE HIDRÓLISE EM 593 nm

Para comprovar essa correlação o coeficiente de Pearson calculado para os dados obtidos no experimento de cinética para celulose bacteriana Azure-RBB foi de r de 0,9856, indicando que existe uma correlação positiva muito alta entre a quantidade de glucose e RBB liberados nas hidrólises da celulose bacteriana tingida, como pode ser observado no GRÁFICO 27.

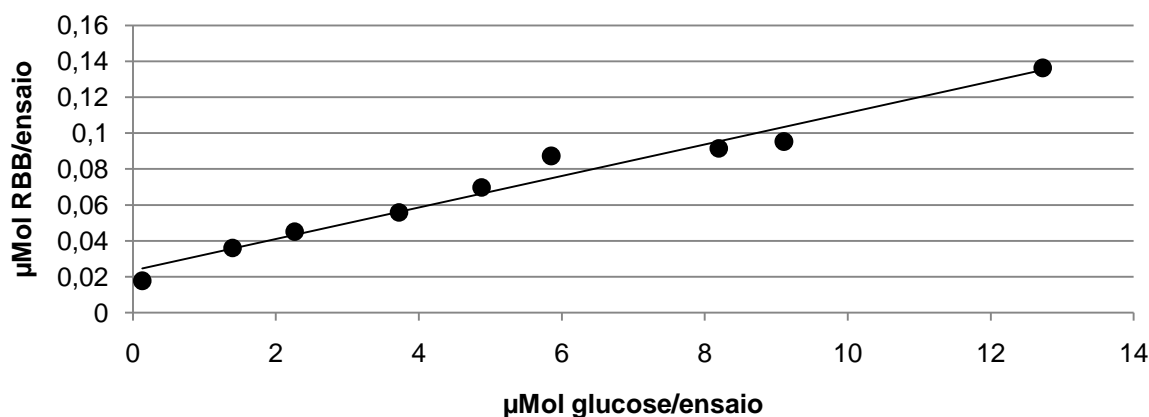


GRÁFICO 27 - CORRELAÇÃO DE PEARSON ENTRE CORANTE RBB E AÇUCARES REDUTORES EM MMOL/ENSAIO LIBERADOS DURANTE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

O valor encontrado no teste t , foi de 15,4214, ou seja, maior do que o valor tabelado de 3,4995 com nível de confiança de 99 %. Portanto, a hipótese nula é rejeitada, provando que existe correlação entre os valores de glucose e RBB encontrados.

5.6 ANÁLISE POR CCD E DENSITOMETRIA

A análise dos produtos de hidrólise de CB *in natura* e CB Azure-RBB utilizando Cromatografia em Camada Delgada (CCD), utilizando como fase móvel, acetonitrila:isopropanol:água (15:3:6), mostra que após 72h de incubação a 40°C ocorre à hidrólise enzimática de praticamente toda celulose a celobiose (R_f 0,49) e glucose (0,61) livre, como podemos observar na esquerda FIGURA 24. Antes de revelar a placa com orcinol sulfúrico à quente, figura da direita, observamos que o corante RBB livre aparece com R_f 0,95, e que no hidrolisado as manchas azuis aparecem mais abaixo, com R_f 0,82, a qual foi revelada para carboidratos com o orcinol. Estes dados indicam que a lavagem para remoção do corante não-ligado foi efetiva, e que o corante RBB está ligado covalentemente a(s) unidade(s) de glucose.

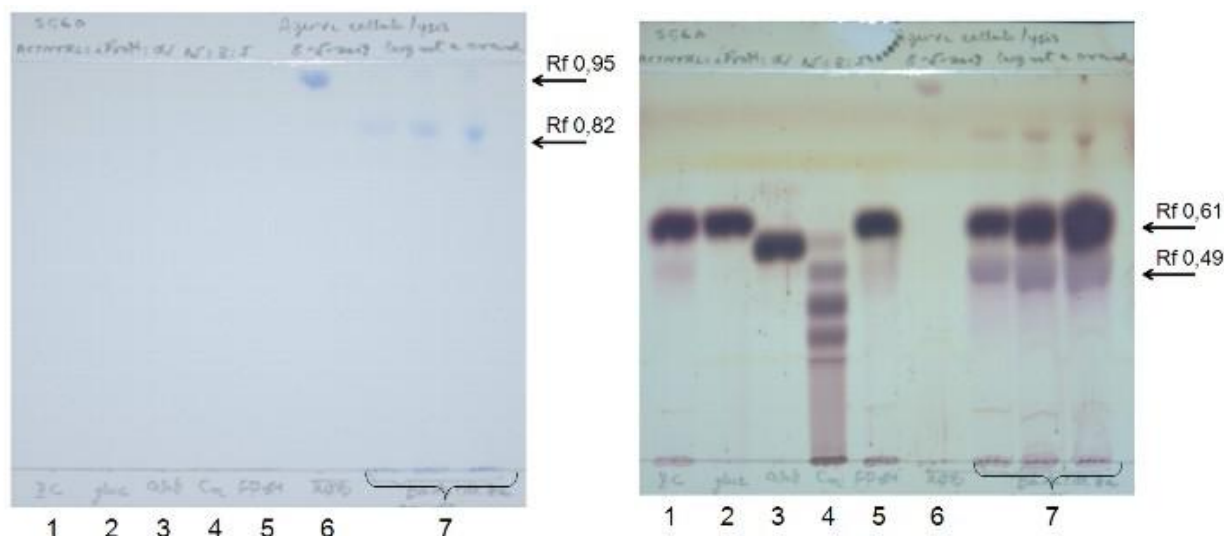


FIGURA 24 - CCD DOS PRODUTOS DE HIDRÓLISE COM ENZIMAS CELULOLÍTICAS DE CELULOSE BACTERIANA *in natura* E AZURE-RBB

NOTA: (1) Celulose bacteriana *in natura*; (2) Padrão de Glucose; (3) Padrão de Celobiose; (4) Padrão de Celo-oligossacarídeos; (5) Papel de filtro Whatman n.1; (6) Azul Brilhante de Remazol R livre e (7) Hidrolisado de Celulose Bacteriana Azure-RBB em concentrações crescentes. Placa da esquerda sem revelador e placa da direita revelada com orcinol sulfúrico.

Analisando a placa por densitometria é possível verificar melhor os perfis das amostras 4 (celo-oligossacarídeos) e 7 (CB Azure-RBB - primeiro ponto). O hidrolisado de CB Azure-RBB durante 72 h mostra uma maior proporção de glucose livre, seguida de celobiose, conforme GRÁFICO 28, mostrando que a hidrólise com as enzimas celulolíticas foi eficiente.

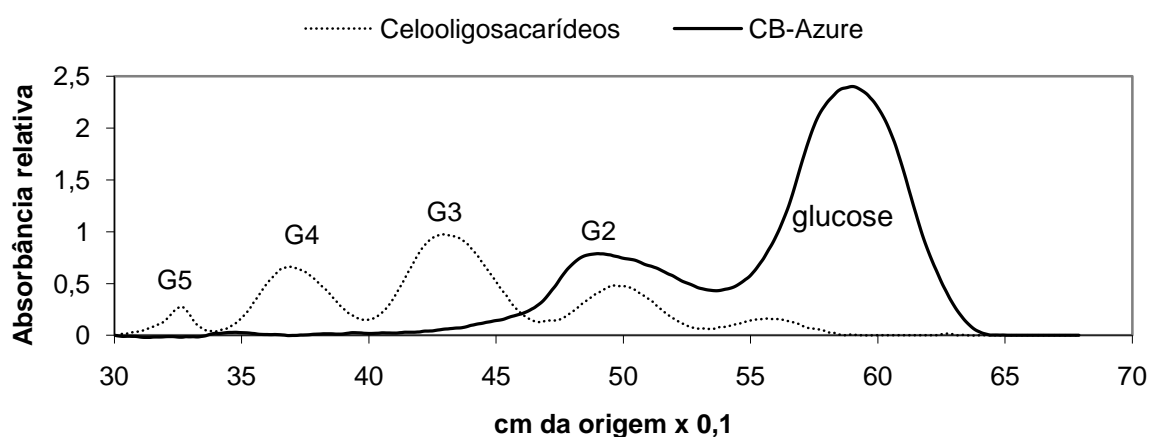


GRÁFICO 28 - DENSITOMETRIA A650 NM DOS INCUBADOS DE CELULOSE BACTERIANA

Apesar do maior produto de hidrólise ser glucose seguido de celobiose, existem ainda os produtos coloridos, de Rf maior, que correm acima da mancha de

glucose. Para a determinação destes produtos covalentemente ligados ao corante RBB, foi realizada cromatografia preparativa em coluna dos hidrolisados de CB Azure-RBB. Como fase estacionária foi utilizada sílica gel 60 (Merck 0,063-0,200 mm) e fase móvel acetonitrila: isopropanol: água (15:3:6), quando foram coletadas 160 frações caracterizadas pela coração azul.

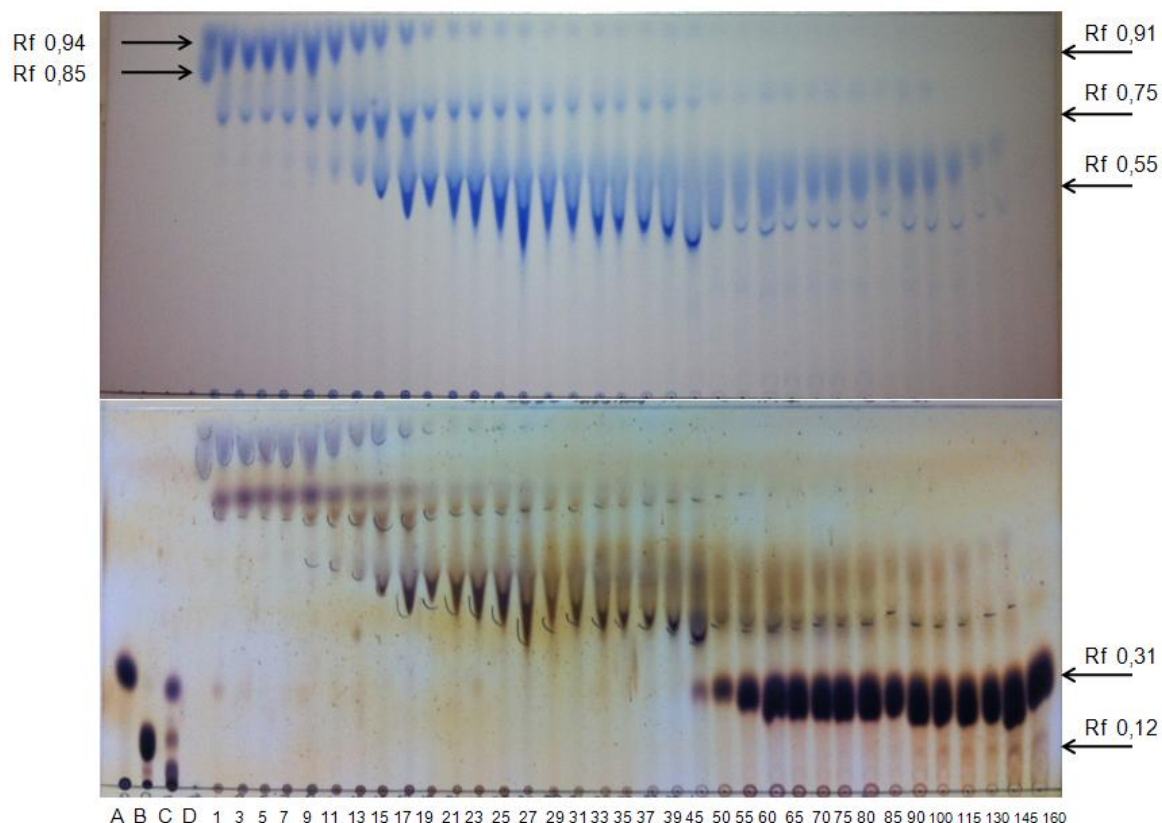


FIGURA 25 - CCD DE FRAÇÕES OBTIDAS POR COLUNA PREPARATIVA DE HIDRÓLISADO DE CELULOSE BACTERIANA AZURE-RBB

NOTA: Placa sem revelador (acima) e com revelador orcinol sulfúrico (abaixo). A, B e C – Padrões de glucose, celobiose e celo-oligossacarídeos; D – Padrão do corante RBB livre; 1-160 – Frações Azure-RBB obtidas em coluna de sílica preparativa.

Através de uma CCD, FIGURA 25, placa superior, nota-se três principais produtos coloridos. O primeiro com Rf 0,91 localizado entre as duas manchas que aparecem para o padrão RBB em Rf em 0,85 e 0,94. Os outros dois produtos coloridos aparecem logo abaixo com Rf 0,75 e 0,55. A placa também foi revelada com orcinol sulfúrico, placa inferior, e nota-se a presença de glucose livre a partir da fração 45 e de celobiose livre em pequenas quantidades a partir da fração 90, mostrando a eficiência da coluna para separar os produtos coloridos dos açúcares livres não-tingidos, que estão em maior quantidade. Foram feitas CCDs

preparativas onde as três bandas principais foram recolhidas, extraídas com metanol: água (6:4), liofilizadas (Labconco Freezone 1) e posteriormente analisadas por RMN.

5.7 ANÁLISE POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

Amostras de CB *in natura* e Azure-RBB foram analisadas por RMN em estado sólido, utilizando técnica de rotação de ângulo mágico com 7 Hz de velocidade de giro, e comparadas com o padrão de RBB. Observando o GRÁFICO 29, relativo ao espectro de CP-MAS ^{13}C RMN das amostras de CB *in natura* e CB Azure-RBB em estado sólido, percebe-se que houve um leve deslocamento dos picos para campos mais altos. Na região entre 65-60 ppm, referente aos C6 das unidades de glucose houve uma diminuição da intensidade do pico.

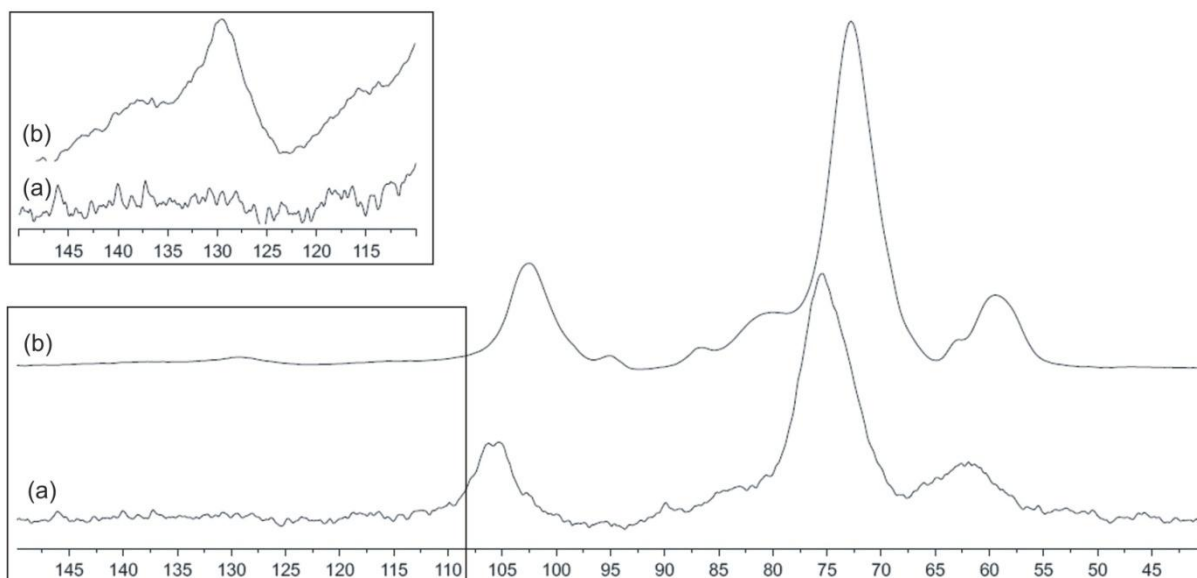


GRÁFICO 29 - ESPECTRO DE RMN ^{13}C POR CP-MAS DA CELULOSE BACTERIANA *in natura* E AZURE-RBB

NOTA: (a) Celulose Bacteriana *in natura*; (b) Celulose Bacteriana Azure. No detalhe, a região entre 150 e 110 ppm, com aumento de intensidade dos picos.

Os sinais em 89-83 ppm são referentes ao C4, sendo que picos maiores em 89 representam maior cristalinidade. Entre 80-70 referem-se a C2, C3 e C5. O sinal

em 105 ppm refere-se a C1 (HEINZE,2001). A mudança mais importante é observada no detalhe, onde com o aumento da intensidade (ampliação), é possível ver na região entre 150-110 ppm pico correspondente aos carbonos aromáticos da CB Azure-RBB. No espectro completo, o sinal aparece com baixa intensidade, uma vez que a quantidade de unidades de glucose é superior a de RBB.

Quando o espectro obtido para o corante livre por TBI ^1H RMN é comparado com o espectro HR-MAS ^1H RMN da CB Azure-RBB em estado sólido, nota-se a presença de dois sinais triplete em 4,05 e 3,71 ppm correspondentes aos carbonos CH_2 do corante RBB, apresentados no GRÁFICO 30. Analisando a ampliação desta região, observa-se o deslocamento dos picos para 4,46 (triplete) e 3,91 (triplete) caracterizando a ligação covalente no grupo sulfito do corante. Os diversos picos entre 8,25 e 7,50 ppm são referentes aos carbonos aromáticos e não apresentaram alterações.

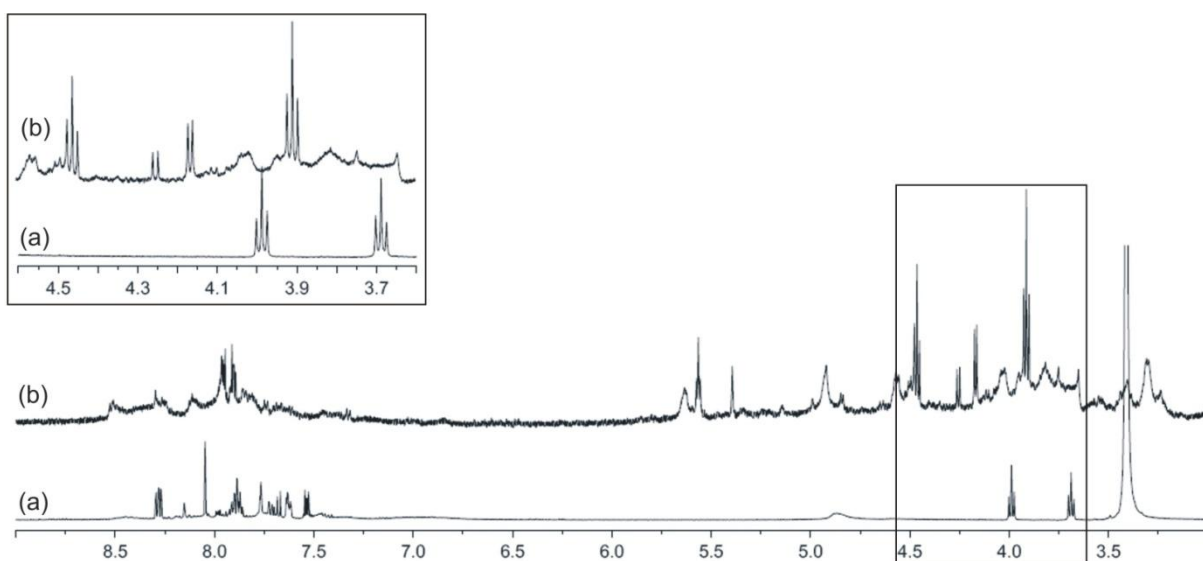


GRÁFICO 30 - ESPECTRO DE RMN ^1H POR HR-MAS DA CELULOSE BACTERIANA AZURE-RBB E POR TBI DO PADRÃO DE CORANTE RBB R

NOTA: (a) Padrão RBB R; (b) Celulose Bacteriana Azure-RBB. No detalhe, ampliação da região entre 4,6 e 3,6 ppm.

Para a análise dos resultados para as três bandas obtidas por hidrólise de CB Azure-RBB e separadas por colunas cromatográficas preparativas, foi necessário salientar a zona de maior importância para os espectros de C^{13} RMN dos padrões de RBB, glucose e celobiose.

As regiões de deslocamento dos picos onde possivelmente ocorre a ligação entre carboidrato e corante foram ampliadas. Para o RBB os picos mais importantes são em 59,2 e 54,8 ppm referentes aos CH₂ subsequentes ao grupo sulfito do corante. Na glucose o principal pico é em 61,3 ppm correspondente ao CH₂ do C6 e para a celobiose os dois picos correspondentes aos CH₂ dos C6 aparecem em 60,9 e 60,5 ppm, como podemos observar no GRÁFICO 31.

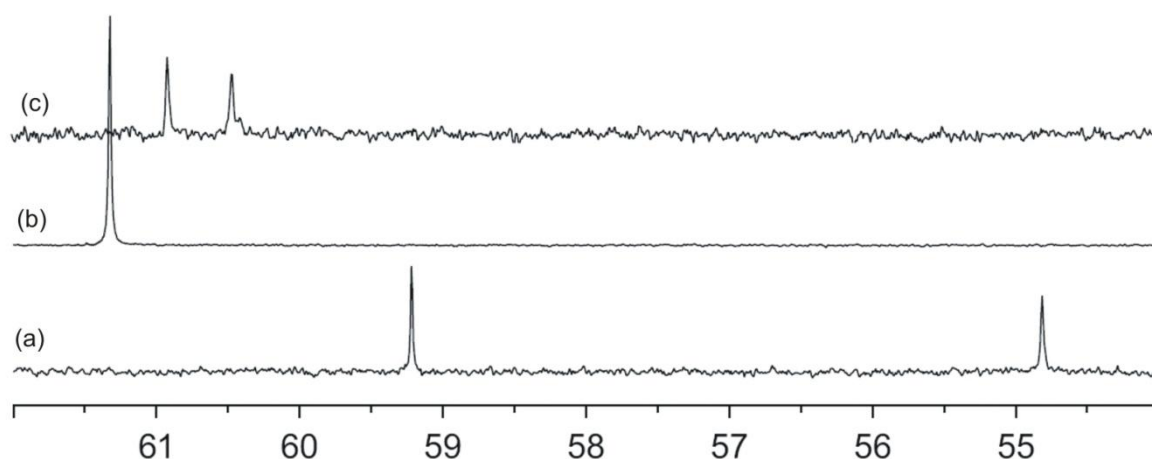


GRÁFICO 31 - ESPECTRO DE RMN ¹³C DOS PADRÕES DE CORANTE RBB R, GLUCOSE E CELOBIOSE

NOTA: (a) Padrão de RBB; (b) Glucose; e (c) Celobiose. Ampliações correspondentes as regiões de deslocamentos dos picos correspondentes a possível ligação entre carboidrato e corante.

Analisando os espectros de HSQC e HMBC para a Banda 1, não há nenhum indicativo da presença de carboidratos. Porém os picos não são conclusivos quanto a pureza do corante, indicando uma provável deterioração do corante.

Nos gráficos para as Bandas 2 e 3, tanto de HMBC quanto de HCSQ, percebe-se alterações nos carbonos CH₂ subsequentes ao grupo sulfito do corante, indicando a ligação de estruturas semelhantes ao RBB. Nos demais carbonos e hidrogênios aromáticos do RBB não houveram alterações, por estarem dispostos distantes do grupo sulfito, onde ocorre a ligação.

No GRÁFICO 32, estão apresentados os espectros 2D de ¹H-¹³C RMN de HSQC para as Bandas 2 e 3, na ampliação da região entre 74-52 /3,85-3,45 ppm. Para a Banda 2 observa-se os picos 3,75/64,60 e 3,61/55,70 com intensidade negativa (cor azul) referentes aos grupos CH₂ mais próximos ao grupo sulfito, onde ocorre a ligação, respectivamente C1 e C2 do RBB. Na Banda 3 ocorre deslocamento similar, para 3,75/64,51 e 3,66/55,29. Nesta mesma região, para a

Banda 2, percebemos a presença de outros dois picos com intensidade negativa, relativos a CH₂, em 3,51/60,33 e 3,52/70,25, referentes ao C6 da glucose sem nenhuma ligação e com a ligação covalente com o RBB, respectivamente. Já na Banda 3 percebemos quatro picos em 3,71/61,12 e 3,62/61,04, referentes aos CH₂ dos C6 das unidades de glucose da celobiose sem ligação e 3,64/70,68 e 3,52/70,27 dos CH₂ dos C6 em que ocorreu ligação com o corante.

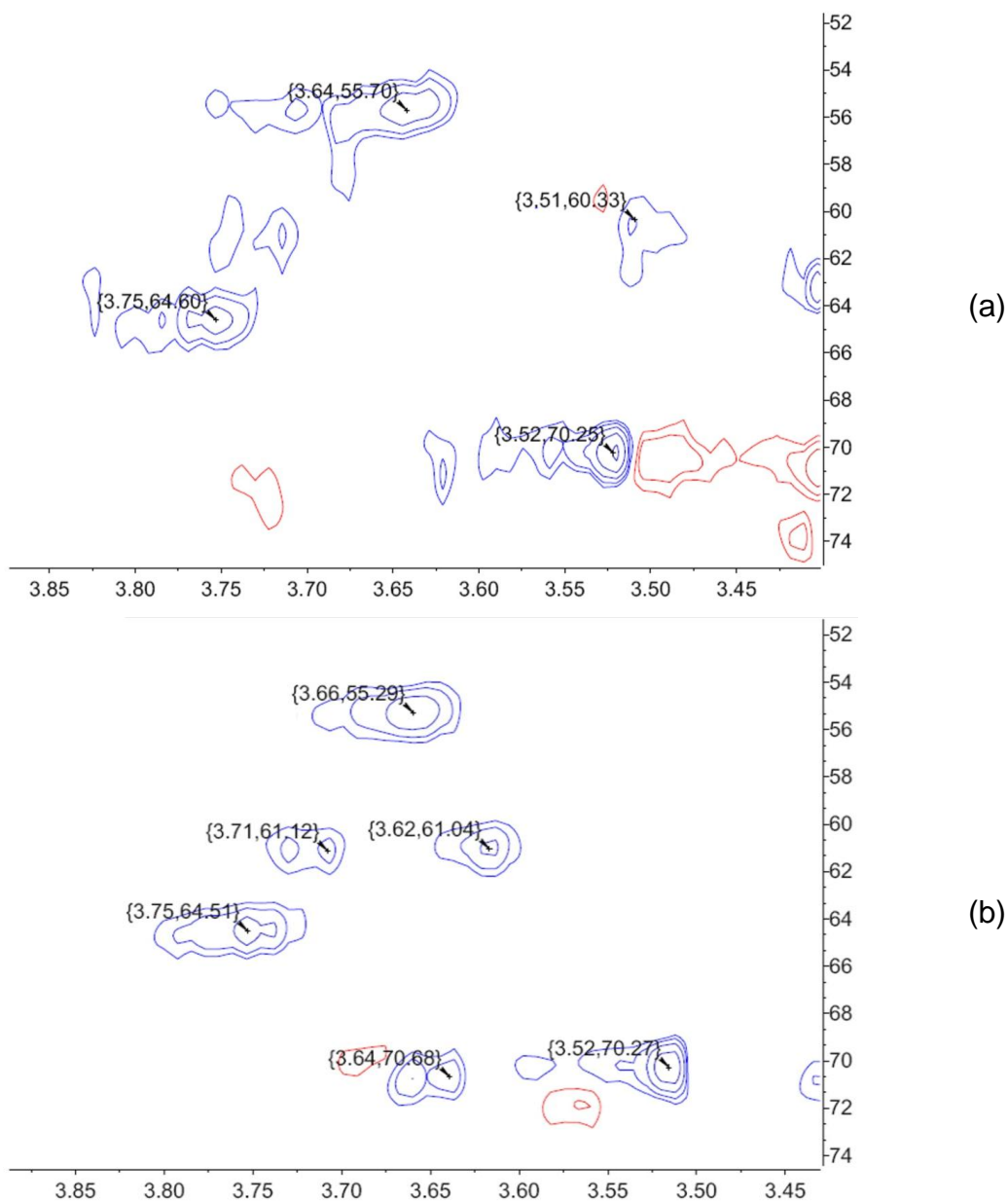


GRÁFICO 32 - REGIÃO ENTRE 3,85-3,45 E 74-52PPM DO ESPECTRO DE RMN 2D ¹H-¹³C POR HSQC DAS BANDAS 2 E 3

NOTA: (a) Banda 2, picos 3,61/55,70, 3,51/60,33, 3,75/64,60 e 3,52/70,25. (b) Banda 3, picos 3,66/55,29, 3,71/61,12, 3,62/61,04, 3,75/64,51, 3,64/70,68 e 3,52/70,27. Em azul intensidades negativas relativas a CH₂.

No GRÁFICO 33, estão os espectros 2D de ^1H - ^{13}C RMN de HSQC das Bandas 2 e 3, ampliados na região entre 110–85/5,0–4,5 ppm. É possível observar dois picos em 4,88/92,59 e 4,69/99,52, para a Banda 2, referentes ao carbono anomérico da glucose, C1, na conformação α e β . Na Banda 3, além destes mesmos dois picos, (4,88/92,44 e 4,31/97,43) ainda observa-se um terceiro pico em 4,27/103,60 referente ao C1 envolvido na ligação glicosídica da celobiose.

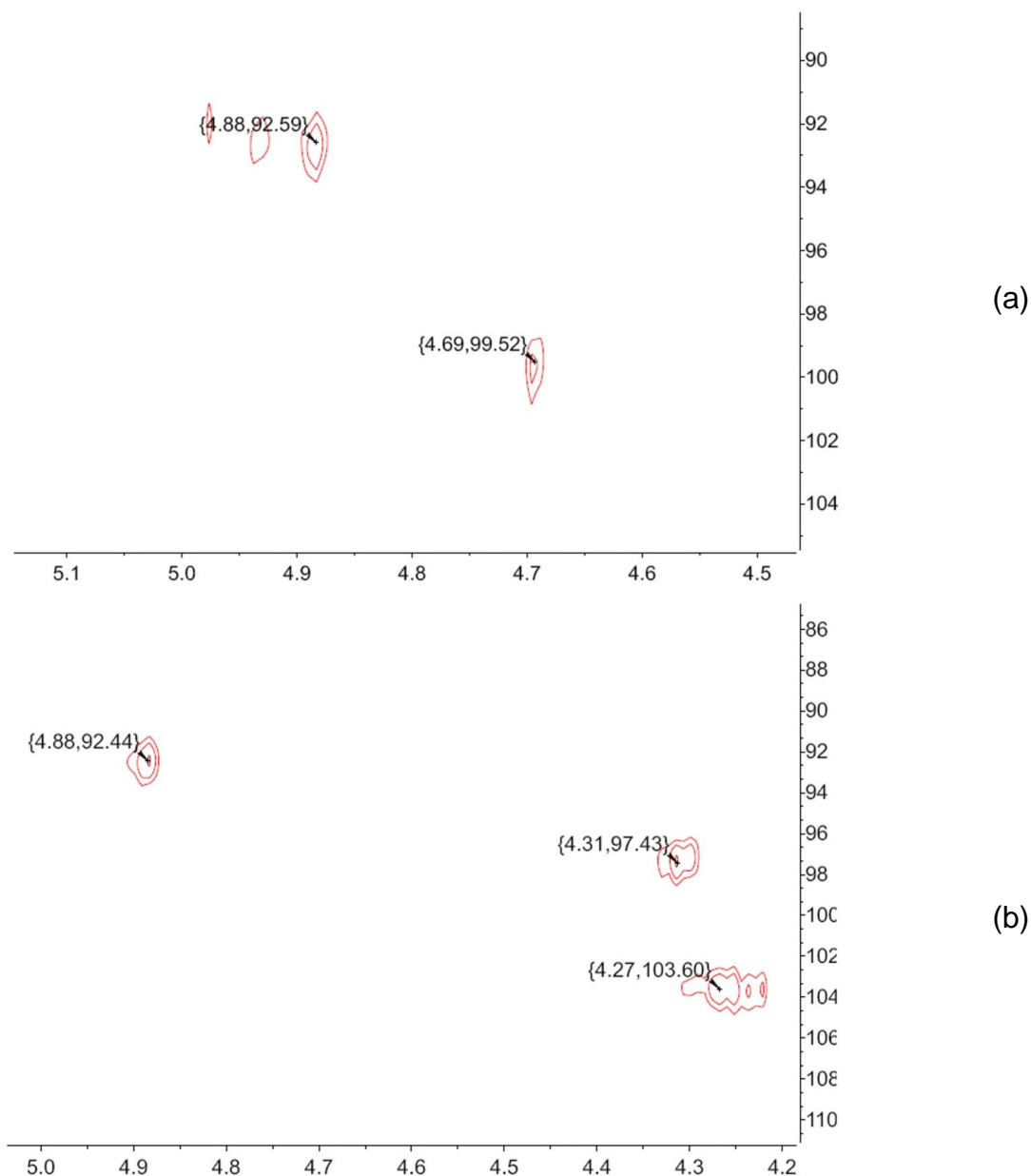


GRÁFICO 33 - REGIÃO ENTRE 5,2-4,2 E 110-85 PPM DO ESPECTRO DE RMN 2D ^1H - ^{13}C POR HSQC DAS BANDAS 2 E 3

NOTA: (a) Banda 2, picos 4,88/92,59 e 4,69/99,52. Em Azul intensidades negativas relativas a CH_2 . (b) Banda 3, picos 4,88/92,44, 4,31/97,43 e 4,27/103,60. Ampliação da região entre 104 - 90 ppm e 5,1 - 4,5 ppm contendo os picos 4,88/92,59 e 4,69/99,52.

Com os resultados de RMN das membranas de CB in natura e CB Azure-RBB e seus hidrolisados, foi possível comprovar que o tingimento com o corante RBB sob condição alcalina moderada (50 mM NaOH) ocorreu de forma eficiente através de ligação covalente, entre os C6 das unidades de glucose presentes na celulose e o grupamento sulfito do corante RBB, conforme FIGURA 26.

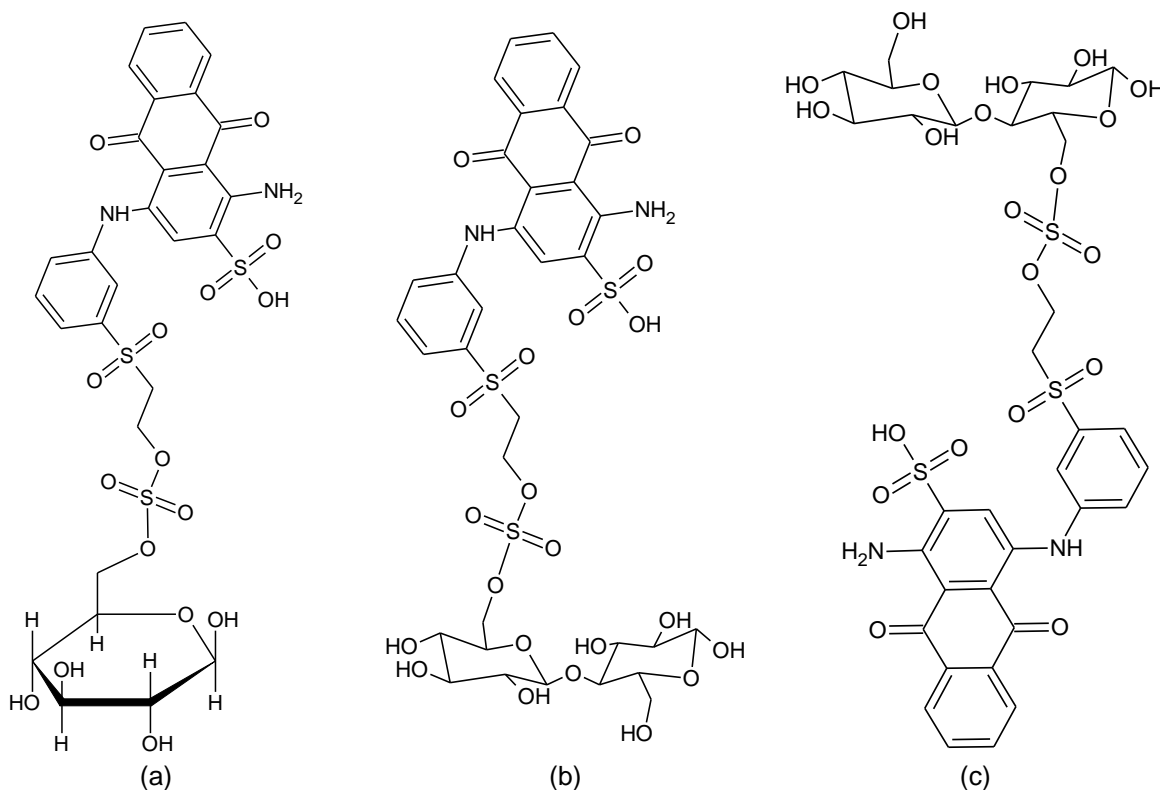


FIGURA 26 - ESTRUTURA MOLECULAR DA GLUCOSE-RBB E CELOBIOSE-RBB

NOTA: (a) corante RBB R ligado covalentemente ao C6 da glucose; (b) corante RBB R ligado covalentemente ao C6, do primeiro resíduo de glucose da celobiose; (c) corante RBB R ligado covalentemente ao C6', do segundo resíduo de glucose da celobiose.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Cepas de *Gluconacetobacter xylinus* são convenientemente cultivados, a partir de fermentado acético de vinho tinto, em meio caldo Alabama modificado, contendo sacarose como fonte de carbono, 5% de etanol e 100.000 UI/L de nistatina, obtendo como produto do cultivo películas flotantes de celulose bacteriana.
- O cultivo de *Gluconacetobacter xylinus* utilizando fruto-oligossacarídeos (FOS) como fonte alternativa de carbono mostra maior crescimento de células totais por mL, quanto maior o teor de oligossacarídeos de frutose obtidos através de hidrólise cítrica ou fosfórica de inulina, sendo que a produção de membranas de celulose bacteriana foi equivalente a produzida pelo meio contendo sacarose. O cultivo utilizando inulina hidrolisada cítrica por 25 minutos mostrou produção de membrana de celulose bacteriana equivalente a glucose e frutose, porem com maior produção celular.
- A cinética de crescimento indica isolamento de *Gluconacetobacter xylinus* dos subgêneros *sucrofermentans* e/ou *nonacetoxidans*, capazes de incorporar sacarose como fonte de carbono.
- Membranas de celulose bacteriana são eficientemente purificadas através de sucessivas lavagens com agentes químicos aniônicos, confirmado pela ausência de ácidos nucléicos e proteínas por espectrometria UV-Vis em 260 e 280 nm, respectivamente, nas películas analisadas.
- Membranas de celulose bacteriana lavadas são formadas exclusivamente por celulose, preferencialmente celulose tipo I α como comprovado por técnica de reflexão total atenuada no infravermelho médio.
- Membranas de celulose bacteriana são convenientemente tingíveis covalentemente com o corante Azul Brilhante de Remazol R (Azure) em meio moderadamente alcalino, como comprovado por técnicas espectroscópicas de Ressonância Magnética Nuclear, tanto de núcleos ^{13}C quanto ^1H .
- A hidrólise de substratos celulósicos com enzimas do complexo celulolítico mostra a celulose bacteriana *in natura* como substrato mais hidrolisável, seguida de celulose bacteriana Azure-RBB e Avicel® Azure-RBB, sendo que o último exige etapa adicional de centrifugação.

- O teste do potencial de sacarificação das enzimas celulolíticas mostra que a celulose bacteriana *in natura* necessita da menor carga enzimática para hidrólise de 2 mg de açúcar redutor, seguida e celulose bacteriana Azure-RBB.
- Celulose bacteriana Azure-RBB se mostrou bom substrato celulósico para o ensaio de determinação de atividade de enzimas do complexo celulolítico, através de leitura direta do corante RBB (glucose-RBB e Celobiose-RBB) e determinação de açúcares redutores mensurados pelo método DNS, comprovada pelo coeficiente de correlação de Pearson, confirmado através de teste *t*.
- A hidrólise enzimática de celulose bacteriana *in natura* e celulose bacteriana Azure-RBB tem como principal produto a liberação de glucose livre, seguida de celobiose, como comprovado por cromatografia em camada delgada associada a densitometria e como produtos de hidrólise Azure a liberação de glucose-RBB, ligados covalentemente por C6, seguida de celobiose-RBB, como comprovado por técnicas espectroscópicas de Ressonância Magnética Nuclear 2D.

7 PERSPECTIVAS FUTURAS

- Buscar novas cepas de *Gluconacetobacter sp.* produtoras de celulose bacteriana com particularidades físico-químicas melhoradas com vista no aprimoramento do método explorado no presente trabalho;
- Incrementar o coeficiente de absorbância do corante Remazol Azul Brilhante, ou adotar alternativas químicas pertinentes para a obtenção de substratos celulósicos tingidos superiores.

8 REFERÊNCIAS

ADA, K., *et al.* **Adsorption of Remazol Brilliant Blue R using ZnO fine powder: Equilibrium, kinetic and thermodynamic modeling studies.** Journal of Hazardous Materials 165: 637-644, 2009.

AL-GHARABLI, S.I. **Determination of Glucose Concentration in Aqueous Solution Using ATR-WT-IR Technique.** Sensors 9: 6254-6260, 2009.

ALMEIDA, P.D.e SILVA, P.D. **The peak of oil production - Timings and market recognition.** Energy Policy 37(4): 1267-1276, 2009.

BALASUBRAMANIAM, K.e KANNANGARA, P.N. **Sucrose phosphorylase and invertase activities in bacteria.** Journal of the National Science Council of Sri Lanka 10(2): 169-180, 1982.

BANSAL, I.K., *et al.* **Correlation - It's interpretation and importance.** 2008. Acesso em 27 de fevereiro de 2011, disponível em <http://www.egyankosh.ac.in/handle/123456789/25740>.

BARROS-NETO, B., SCARMINIO, I.S.e BRUNS, R.E. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria.** 3ª Campinas: Editora da Unicamp, 2007.

BIELY, P., MISLOVICOVÁ, D.e TOMAN, R. **Remazol Brilliant Blue-Xylan: A Soluble Chromogenic Substrate for Xylanases.** Methods in Enzymology 160: 536-541, 1988

BNDES. **Bioetanol de cana-de-açúcar: Energia para o desenvolvimento sustentável.** Rio de Janeiro: BNDES e CGEE, 2008.

BRISTOL, U.O. **Fibre-Reactive Dyes.** Acesso em 25 de agosto de 2009, disponível em <http://www.chm.bris.ac.uk/webprojects2002/price/reactive.htm>.

BUCKERIDGE, M.S., SANTOS, W.D.D.e SOUZA, A.P.D. **Instituto de Biociências da USP - As rotas do etanol celulósico no Brasil.** 2011. Acesso em 2 de março, disponível em <http://www.ib.usp.br/>.

CAMPOS, A. **Opep eleva previsão de alta da demanda por petróleo.** 2010. Acesso em 17 de junho, disponível em

http://economia.estadao.com.br/noticias/Economia+Geral,opec-eleva-previsao-de-alta-da-demanda-por-petroleo,not_17794.htm.

CARVALHO, W.C. **Técnicas Médicas de Hematologia e Imuno-Hematologia**. Belo Horizonte: Coopmed editora, 1994.

CHANG, T.-H.e SU, H.-M. **The substitutive effect of biofuels on fossil fuels in the lower and higher crude oil price periods**. *Energy* 35(7): 2807-2813, 2010.

CHÁVEZ-PACHECO, J.L., *et al.* **Partial bioenergetic characterization of *Gluconacetobacter xylinum* cells released from cellulose pellicles by a novel methodology**. *Journal of Applied Microbiology* 99(5): 1130-1140, 2005.

CLASEN, C.e KULICKE, W.M. **Determination of viscoelastic and rheo-optical material functions of water-soluble cellulose derivatives**. *Progress in Polymer Science* 26(9): 1839-1919, 2001.

CLEENWERCK, I., VOS, P.D.e VUYST, L.D. **Phylogeny and differentiation of species of the genus *Gluconacetobacter* and related taxa based on multilocus sequence analyses of housekeeping genes and reclassification of *Acetobacter xylinus* subsp. *sacrofermentans* as *Gluconacetobacter sacrofermentans* (Toyosaki *et al.* 1996) sp. nov., comb. nov.** *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 60: 2277-2283, 2010.

COHEN, J., *et al.* **Applied Multiple Regression/Correlation Analysis for the Behavioral Sciences**. Mahwah: Lawrence Erlbaum Associates, 2003.

CORTI, G.S., *et al.* **Estudo da Capacidade de Complexação de Íons Cu⁺² em Solução Aquosa Usando Celulose Modificada com Anidrido Succínico e com Poliaminas**. *Polímeros: Ciência e Tecnologia* 14(005): 313-317, 2004.

CUSTODIO, R., KUBOTA, L.T.e ANDRADE, J.C.D. **Leis dos processos de absorção da radiação**. 2000. Acesso em 10 de março de 2011, disponível em <http://chemkeys.com/br>.

DECKER, S.R., *et al.* **Automated filter paper assay for determination of cellulase activity**. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 105-108: 689-703, 2003.

DUBOIS, M., *et al.* **Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances**. *Analytical Chemistry* 28(3): 350-356, 1956.

DUMITRIU, S. **Polysaccharides: Strutral Diversity and Functional Versality**. 1st. ed. New York, USA: Copyright by Marcel Dekker, 1998.

ELTON, E.F. **Method for alkaline delignification of lignocellulosic fibrous material at a consistency which is raised during reaction**. Patente n° US 4806203. 21/02/1989.

FERNLEY, H.N. **The use of reactive dyestuffs in enzimology: New substrates for cellulolytic enzymes**. Biochemical Journal 87(1): 90-95, 1963.

FONTANA, J.D. **Bionegócios: celulose (II) bacteriana**. O Estado do Paraná, Ciência e Tecnologia. Curitiba, 26 de setembro, 2004a.

FONTANA, J.D. **Celulose 1 - Algodão em alta**. O Estado do Paraná, Ciência e Tecnologia. Curitiba, 19 de setembro, 2004b.

FONTANA, J.D., *et al.* **Acetobacter cellulose pellicle as a temporary skin substitute**. Applied Biochemistry and Biotechnology 24-5: 253-264, 1990.

FONTANA, J.D., *et al.* **Acetobacter cellulosic biofilms search for new modulators of cellulogenesis and native membrane treatments**. Applied Biochemistry and Biotechnology 63-5: 327-338, 1997.

FONTANA, J.D., *et al.* **Starch Depolymerization with Diluted Phosphoric Acid and Application of the Hydrolysate in Astaxanthin Fermentation**. Food Technology and Biotechnology 46(3): 305-310, 2008.

FONTANA, J.D., PASSOS, M.e GRZYBOWSKI, A. INPI. **Processo de hidrólise parcial cítrica ou fosfórica de inulina para a obtenção de fruto-oligossacarídeos - FOS**. Patente n° PI 0703206-4 09/07/2007.

GHOSE, T.K. **Measurement of Cellulase Activities**. Pure & Appl. Chem. 59(2): 257-268, 1987.

GOHO, A. **Technology Review - Cellulolytic Enzymes**. 2010. Acesso em, disponível em www.technologyreview.com.

GRANDE, C.J., *et al.* **Development of self-assembled bacterial cellulose-starch nanocomposites**. Materials Science and Engineering: C 29(4): 1098-1104, 2009.

GROMET-ELHANAN, Z.e HESTRIN, S. **Synthesis of Cellulose by Acetobacter xylinum - VI. Growth on Citric Acid-Cycle Intermediates.** Journal Bacteriol. 85: 284-292, 1963.

GRZYBOWSKI, A. **Hidrólise parcial cítrica ou fosfórica de inulina para a obtenção de fruto-oligossacarídeos (FOS).** Curitiba-PR, Universidade Federal do Paraná, UFPR. Mestrado em Ciências Farmacêuticas

HAMAIDE-REUTERS, S. **Crise deve desacelerar produção mundial de etanol em 2009 - Licht.** O Estadão, São Paulo, 4 de novembro, 2008.

HARRIS, D.C. **Análise Química Quantitativa.** 5a. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2001.

HEINBERG, R. **It's Time To Deal With Peak Oil.** 2010. Acesso em 17 de junho, disponível em <http://www.countercurrents.org/heinberg200310.htm>.

HEINZE, T.e LIEBERT, T. **Unconventional methods in cellulose functionalization.** Progress in Polymer Science 26(9): 1689-1762, 2001.

JARVIS, M.C. **Interconversion of the Ia and Ib crystalline forms of cellulose by bending.** Carbohydrate Research 325: 150-154, 2000.

KLEINERT, T.N. **Mechanisms of alkaline delignification - I.The overall reaction pattern.** Tappi 49(2): 53-57, 1966.

KLYOSOV, A.A. **Industrial Enzyme Engineering.** 6 Volume Treatise: Harvard Medical School, 1995.

KOLONKO, K. **Reactive Dyes.** 2005. Acesso em 11 de março, disponível em <http://www.chem.wisc.edu/areas/organic/studsemin/kolonko/Kolonko-Sem.pdf>.

KORNMANN, H., *et al.* **Influence of Nutritional Factors on the Nature, Yield, and Composition of Exopolysaccharides Produced by *Gluconacetobacter xylinus* I-2281.** Applied and environmental microbiology 69(10): 6091-6098, 2003.

LAI, T.E., PULLAMMANAPPALLIL, P.C.e CLARKE, W.P. **Quantification of cellulase activity using cellulose-azure.** Talanta 69(1): 68-72, 2006.

LEE, H.C.e ZHAO, X. **Effects of mixing conditions on the production of microbial cellulose by *Acetobacter xylinum*.** Biotechnol. Bioprocess Eng. 4: 41-45, 1999.

LEISOLA, M.e LINKO, M. **Determination of the solubilizing activity of a cellulase complex with dyed substrates.** Analytical Biochemistry 70(2): 592-599, 1976.

LEVINE, D.M., *et al.* **Estatística: teoria e aplicações.** 5a. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2008.

LIST, V. **Validation of publication of new names and new combinations previously effectively published outside the IJSB - Validation List n. 64.** Journal of Systematic Bacteriology 48: 327-328, 1998.

LIU, Z.L., *et al.* **Adaptive response of yeasts to furfural and 5-hydroxymethylfurfural and new chemical evidence for HMF conversion to 2,5-bis-hydroxymethylfuran.** Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 31: 345-352, 2004.

LPSN. **List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature Formerly List of Bacterial names with Standing in Nomenclature.** 2011. Acesso em 2 de março, disponível em <http://www.bacterio.cict.fr/>.

LYND, L.R., *et al.* **Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology.** Microbiology and Molecular Biology Reviews 66(3): 506-577, 2002.

MCMILLAN, J.D. **Bioethanol production: Status and prospects.** Renewable Energy 10(2-3): 295-302, 1997.

MILLER, G.L. **Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar.** Analytical Chemistry 31(3): 426-428, 1959.

MINORU, Y., *et al.* **Mode of action of cellulases on dyed cotton with a reactive dye.** Bioscience, biotechnology, and biochemistry 69(1): 45-50, 2005.

MUSSATO, S.I., *et al.* **The effect of agitation speed, enzyme loading and substrate concentration on enzymatic hydrolysis of cellulose from brewer's spent grain.** Cellulose 15: 711-721 2008.

MYUNG-HEE, K., *et al.* **Antioxidant Activity and α -Glucosidase Inhibitory Potential of Onion (*Allium cepa* L.) Extracts.** *Biotechnology in Food Science* 19(1): 159-164, 2010.

NAKAI, T., *et al.* **Enhancement of cellulose production by expression of sucrose synthase in *Acetobacter xylinum*.** *Applied Biological Sciences* 96: 14-18, 1999.

NELSON, D.L.e COX, M.M. **Lehninger, Principios de Bioquímica.** 4 ed. São Paulo: Sarvier, 2006.

OPEC. **Data Graphs.** 2010. Acesso em 17 de junho, disponível em http://www.opec.org/opec_web/en/data_graphs.

PALMISANO, A.C., MARUSCIK, D.A.e SCHWAB, B.S. **Enumeration of fermentative and hydrolytic micro-organisms from three sanitary landfills.** *J Gen Microbiol* 139(2): 387-391, 1993.

PASSOS, M. **Valorização Biotecnológica do Hidrolisado Fosfórico de Amido de Mandioca: Produção de Biomassa e Astaxantina Utilizando a Levedura *Xanthophyllomyces dendrorhous*.** Curitiba-PR, Universidade Federal do Paraná, UFPR. Doutorado

PÉREZ, S.e MACKIE, B. **Structure and Morphology of Cellulose.** 2001. Acesso em 20 de fevereiro de 2011, disponível em <http://glyco3d.cermav.cnrs.fr/glyco3d/lessons/cellulose/index.html>.

PETROBRAS. **Atuação no Pré-Sal.** 2011. Acesso em, disponível em <http://www.petrobras.com.br/pt/energia-e-tecnologia/fontes-de-energia/petroleo/presal/>.

PORTA, M.J.O., *et al.* **The influence of lipid and lifestyle factors upon correlations between highly prevalent organochlorine compounds in patients with exocrine pancreatic cancer.** *Environment International* 33(7): 946-954, 2007.

RFA. **World Fuel Ethanol Production.** 2010. Acesso em 7 de outubro, disponível em <http://www.ethanolrfa.org>.

ROBERFROID, M.B. **Part II Inulin: Origin, Chemistry, Biochemistry and Technological Properties In - Inulin-type fructans: functional food ingredients.** Boca Raton, London New York, Washington, D.C: CRC PRESS, 2005.

ROEHR, M., *et al.* **The Biotechnology of Ethanol: Classical and Future Applications.** Weinheim, Alemanha: WILEY-VCH, 2001.

ROMLING, U. **Molecular biology of cellulose production in bacteria.** Research in Microbiology 153: 205-212, 2002.

SAMEJIMA, M., *et al.* **Enzymatic hydrolysis of bacterial cellulose.** Carbohydrate Research 305(2): 281-288, 1997.

SANDGREN, M., STÅHLBERG, J.e MITCHINSON, C. **Structural and biochemical studies of GH family 12 cellulases: improved thermal stability, and ligand complexes.** Progress in Biophysics and Molecular Biology 89(3): 246-291, 2005.

SANOFI-AVENTIS. **Bula do Medicamento Flagyl® Nistatina.** 2010. Acesso em 14 de junho, disponível em [http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/BM/BM\[26412-1-0\].PDF](http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/BM/BM[26412-1-0].PDF).

SAXENA, I.M., *et al.* **Biosynthesis of cellulose.** Progress in Biotechnology, Elsevier. Volume 18: 69-76, 2001.

SOKOLLEK, S.J., HERTEL, C.e HAMMES, W.P. **Cultivation and preservation of vinegar bacteria.** Journal of Biotechnology 60: 195-206, 1998.

SOKOLNICKI, A.M., *et al.* **Permeability of bacterial cellulose membranes.** Journal of Membrane Science 272(1-2): 15-27, 2006.

SOLOMONS, T.W.G.e FRYHLE, C.B. **Química Orgânica - Volume 1.** 7a. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2001.

STICHNOTHE, H.e AZAPAGIC, A. **Bioethanol from waste: Life cycle estimation of the greenhouse gas saving potential.** Resources, Conservation and Recycling 53(11): 624-630, 2009.

SUAPESQUISA. **Camada Pré-Sal.** 2010. Acesso em 25 de janeiro, disponível em http://www.suapesquisa.com/geografia/petroleo/camada_pre_sal.htm.

TAHER, A.M.e CATES, D.M. **A spectrophotometric investigation of the yellow color that accompanies the formation of furan derivatives in degraded-sugar solutions.** Carbohydr. Res 34: 249-261, 1974.

THOMPSON, D.N.e HAMILTON, M.A. **Production of Bacterial Cellulose from Alternate Feedstocks.** Applied Biochemistry and Biotechnology 91-93(1): 503-513, 2001.

TODA, K., *et al.* **Cellulose production by acetic acid-resistant *Acetobacter xylinum*.** Journal of Fermentation and Bioengineering 84(3): 228-231, 1997.

TOMME, P., *et al.* **Chromatographic separation of cellulolytic enzymes.** Methods in Enzymology, Academic Press. Volume 160: 187-193, 1988.

UFRGS. **Análise Instrumental Aplicada à Polímeros.** 2010. Acesso em 5 de maio, disponível em http://chasqueweb.ufrgs.br/~ruth.santana/analise_instrumental/aula3c.html.

UNICA. **Dados e Cotações - Estatísticas: Produção de Etanol no Brasil.** 2010. Acesso em 7 de outubro, disponível em <http://www.unica.com.br>.

VANDAMME, E.J., *et al.* **Improved production of bacterial cellulose and its application potential.** Polymer Degradation and Stability 59(1-3): 93-99, 1998.

YAMADA, Y., HOSHINO, K.e ISHIKAWA, T. **The phylogeny of acetic acid bacteria based on the partial sequences of 16S ribosomal RNA: the elevation of the subgenus *Gluconoacetobacter* to generic level.** Bioscience, biotechnology, and biochemistry 61: 1244-1251, 1997.

ZANIN, G.M., *et al.* **Brazilian Bioethanol Program.** Applied Biochemistry and Biotechnology 84-86: 1147-1161, 2000.

ZEIKUS, J.G.e NG, T.K. **Continuous spectrophotometric assay of microbial cellulase.** Patente nº US Patent 4403032. 1983.

ZENI, D. **Determinação de Cloridrato de propranolol em medicamentos por espectroscopia no infravermelho com calibração multivariada (PLS).** Santa Maria, RS: UFSM, 2005.

ZUCKERSTÄTTER, G., *et al.* **The elucidation of cellulose supramolecular structure by ¹³C CP-MAS NMR.** Lenzinger Berichte 87: 38-46, 2009.